

Université de Sherbrooke

Caractérisation de l'homologue de PABPN1 (*Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1*) chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*.

par
Caroline Lemieux
Département de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
en vue de l'obtention du grade *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
Avril 2012

Évaluateurs :
Dr. François Bachand, Département de Biochimie
Dr. Xavier Roucou, Département de Biochimie
Dr. Benoît Chabot, Département de Microbiologie et d'Infectiologie
Dr. Pascal Chartrand, Département de Biochimie, Université de Montréal



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-94433-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-94433-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	VII
RÉSUMÉ	IX
INTRODUCTION	1
1. TRANSCRIPTION.....	1
2. MATURATION DE L'ARNm.....	2
2.1 Coiffe	2
2.2 Épissage	4
2.3 Clivage et polyadénylation	7
3. TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION.....	15
3.1 Modèle allostérique.....	16
3.2 Modèle torpedo	16
3.3 Modèle hybride entre allostérique et torpedo	19
4. INTERRELATION ENTRE LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE MATURATION DE L'ARNm.....	20
4.1 Coiffe et épissage.....	20
4.2 Épissage et polyadénylation.....	22
4.3 Polyadénylation et terminaison de la transcription.....	23
5. EXPORT DES ARNm.....	25
5.1 Mécanisme moléculaire de l'export.....	26
5.2 Contrôle de qualité au niveau du pore nucléaire.....	26
6. TRADUCTION	28
6.1 Modification post-traductionnelle.....	29

7. MACHINERIE DE DÉGRADATION.....	31
7.1 Exosome.....	31
7.2 TRAMP.....	35
7.3 Déadénylase.....	38
8. <i>POLY(A)-BINDING PROTEIN</i>	39
8.1 <i>Poly(A)-binding protein</i> cytosolique (PABPC1).....	39
8.2 <i>Poly(A)-binding protein</i> nucléaire (PABPN1).....	43
9. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	49
10. OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	49
RÉSULTATS.....	50
CHAPITRE 1.....	50
RÉSUMÉ.....	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUCTION.....	53
MATERIALS AND METHODS.....	56
RESULTS.....	60
DISCUSSION.....	75
ACKNOWLEDGEMENTS.....	79
REFERENCES.....	80
FOOTNOTES.....	84
CHAPITRE 2.....	85
RÉSUMÉ.....	86
ABSTRACT.....	87
INTRODUCTION.....	88
MATERIALS AND METHODS.....	91

RESULTS	95
DISCUSSION	110
ACKNOWLEDGEMENTS	114
REFERENCES.....	115
CHAPITRE 3.....	122
RÉSUMÉ	123
ABSTRACT	124
INTRODUCTION	125
RESULTS	127
DISCUSSION	145
EXPERIMENTAL PROCEDURES	150
ACKNOWLEDGEMENTS	151
REFERENCES.....	152
SUPPLEMENTARY FIGURES.....	157
SUPPLEMENTARY TABLES	168
SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	180
SUPPLEMENTARY REFERENCES	184
DISCUSSION.....	185
L'importance de la méthylation des arginines	185
Le recrutement de Pab2 aux gènes activement transcrits	187
Régulation de l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2	188
L'insensibilité du pré-ARNm Rpl30-2 au NMD	199
La fonction biologique de la régulation du pré-ARNm Rpl30-2	206
REMERCIEMENTS.....	209
RÉFÉRENCES	210

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Représentation schématique de la maturation co-transcriptionnelle de l'ARNm....	3
Figure 2. L'épissage du pré-ARNm par le spliceosome.....	6
Figure 3. Représentation schématique du clivage et de la polyadénylation chez les mammifères.	10
Figure 4. Représentation schématique de la machinerie de clivage et de la polyadénylation chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	13
Figure 5. Représentation schématique des modèles de terminaison proposés.	17
Figure 6. Mécanisme d'export d'ARNm couplé à la transcription.....	27
Figure 7. Structure de l'exosome et les voies possibles de dégradation de l'ARN par l'exosome.....	32
Figure 8. Mécanisme du complexe TRAMP pour la dégradation d'ARN.	37
Figure 9. Rôle de PABPC1 dans la stabilisation et la traduction de l'ARNm.	42
Figure 10. Structure de PABPN1.....	44
Figure 11. PABPN1 stimule la PAP et contrôle la longueur des queues poly(A).	46

Chapitre 1

Figure 1. Amino acid sequence alignment of nuclear poly(A)-binding proteins from multiple species.....	61
Figure 2. Specific association of Pab2 with RMT1.	63
Figure 3. The arginine-rich domain of Pab2 is arginine methylated by RMT1.....	65
Figure 4. Fission yeast Pab2 is a non-essential nuclear protein.....	68
Figure 5. Pab2 is a poly(A) binding protein required for poly(A) tail length control.	70
Figure 6. Regulation of Pab2 oligomerization by arginine methylation.....	73
Figure 7. Pab2 overexpression induces growth inhibition that is exacerbated in <i>rmt1</i> -null cells.	74

Chapitre 2

Figure 1. Association of Pab2 to active genes precedes that of the characterized 3'-processing factor, Pcf11.....	97
Figure 2. Association of Pab2 to intron-containing genes.....	99
Figure 3. Transcription-dependent recruitment of Pab2 to the <i>NMT1</i> gene.	100
Figure 4. Pab2 interacts with the nascent mRNP in the vicinity of the transcription complex.....	102
Figure 5. Purification of proteins associated with TAP-tagged Pab2.....	103
Figure 6. Pab2 shuttles between the nucleus and cytoplasm.	106
Figure 7. Pab2 associates with translating mRNPs.....	108

Chapitre 3

Figure 1. Pab2 regulates the expression of <i>rpl30-2</i> at the level of the pre-mRNA.	129
Figure 2. Pab2 and the nuclear exosome control <i>rpl30-2</i> expression.	132
Figure 3. Polyadenylation is required for Pab2/Rrp6-dependent degradation of the <i>rpl30-2</i> pre-mRNA.	134
Figure 4. Regulation of Pab2-dependent pre-mRNA decay by heat stress.	136
Figure 5. The expression of several genes is controlled by Pab2-dependent pre-mRNA turnover.....	140
Figure 6. Splicing inhibition promotes pre-mRNA decay by Pab2.....	143
Figure 7. Model for gene regulation by nuclear pre-mRNA decay.....	148
Figure S 1, related to Figure 1. Normal transcription and 3' end processing of <i>rpl30-2</i> in wild-type and <i>pab2Δ</i> strain.	158
Figure S 2, related to Figure 2. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) does not control <i>rpl30-2</i> pre-mRNA levels.	159
Figure S 3, related to Figure 3. Poly(A)-bound Pab2 is required for pre-mRNA decay. ...	161
Figure S 4, related to Figure 5. Analysis of Pab2-dependent pre-mRNA decay by RNA-sequencing. Coordinated upregulation of spliced and unspliced mRNA in <i>pab2Δ</i> cells. ...	163
Figure S 5, related to Figure 6. Cross-regulation of <i>rpl30-2</i> expression by Rpl30-1.	165
Figure S 6, related to Figure 7 & Discussion. Pab2-dependent pre-mRNA decay is independent of deadenylation pathways and of the Mmi1 protein.	167

Discussion

Figure 1. La structure <i>kink-turn</i> pour RPL30 et l'analyse de <i>mFold</i> pour le pré-ARNm et ARNm Rpl30-2 afin d'identifier de possibles structures <i>kink-turn</i>	191
Figure 2. L'analyse de la structure 2D et 3D de la protéine L30 chez <i>S. cerevisiae</i>	195
Figure 3. La protéine Rpl30-1 régule l'épissage de Rpl30-2 par la diminution du recrutement du complexe U2.....	198
Figure 4. Le pré-ARNm Rpl30-2 se localise au noyau et au cytosol.	200

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Table I. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> strains used in this study	56
Table II. <i>Proteins identified by LC-MS/MS from RMT1-TAP purification</i>	60

Chapitre 2

Table 1. Yeast strains used in this study	91
Table 2. Ribosomal proteins and translation factors identified in the Pab2-TAP purification.....	104

Chapitre 3

Table S 1, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in spliced and unspliced mRNA in <i>pab2</i> -null cells as determined by the transread/exon-intron read analysis.....	168
Table S 2, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in total and unspliced mRNA in <i>pab2</i> -null cells as determined by the exon/intron signal analysis.....	172
Table S 3, related to Figure 5. List of overlapping genes from the lists of genes that showed increased levels of spliced and unspliced mRNA using the transreads/exon-intron reads analysis (Table S1) and the exon/intron signals analysis (Table S2).	176
Table S 4. List of <i>S. pombe</i> strains used in this study.....	178

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

3'ss	Site d'épissage 3' de l'intron
5'ss	Site d'épissage 5' de l'intron
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire (cDNA)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARN Pol II	ARN polymérase II
bp	Site de branchement situé dans l'intron
CFI _m /II _m	<i>Cleavage Factor I/II</i> , facteurs spécifiques pour le clivage
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i> , immunoprécipitation de chromatine
CPSF	<i>Cleavage Polyadenylation Specific Factors</i> , facteurs spécifiques pour le clivage et la polyadénylation
CstF	<i>Cleavage stimulation Factor</i> , facteur stimulant le clivage
CTD	<i>Carboxy-terminal domain</i> , domaine carboxy-terminal de l'ARN Pol II
DUE	Élément U-riche en aval du site de clivage chez <i>S. cerevisiae</i>
EE	Élément d'efficacité pour la séquence de clivage et de polyadénylation chez <i>S. cerevisiae</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GST	Glutathione S-transférase
IP	Immunoprécipitation de protéines
kDa	Kilodalton
mRNP	Complexe d'ARNm et de ribonucléoprotéines
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
nt	Nucléotide
OPMD	Dystrophie musculaire oculopharyngée
PABP	<i>Poly(A)-binding protein</i>
PAP	Poly(A) polymérase des eucaryotes
Pap1	Poly(A) polymérase de la levure <i>S. cerevisiae</i>
pb	Paire de base

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne
PE	Élément de positionnement pour la séquence de clivage et de polyadénylation chez <i>S. cerevisiae</i>
Pla1	Poly(A) polymérase de la levure à fission <i>S. pombe</i>
Pré-ARNm	ARN pré-messager
PRMT	<i>Protein arginine methyltransferase</i>
RIP	<i>RNA immunoprecipitation</i> , immunoprécipitation d'ARN
RNase	Ribonucléase
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i> , motif de reconnaissance à l'ARN
RMT	<i>Arginine methyltransferase</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i> , transcription inverse
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> , petits ARNs nucléaires
UUE	Élément U-riche en amont du site de clivage chez <i>S. cerevisiae</i>
WB	Western Blot
WCE	Extrait cellulaire initial
WT	Souche sauvage

RÉSUMÉ**Caractérisation de l'homologue de PABPN1 (*Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1*)
chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*.**

Par

Caroline Lemieux

Département de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé en
vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Biochimie

Deux classes de *poly(A)-binding protein* (PABP) lient la queue poly(A) des ARNm chez la plupart des mammifères: PABPC1 au cytosol et PABPN1 au noyau. PABPC1 stimule la traduction des ARNm tandis que PABPN1 stimule la processivité de la poly(A) polymérase tout en contrôlant la taille des queues poly(A). Il est à noter que les orthologues de PABPC1 sont bien caractérisés chez la levure, toutefois un homologue de PABPN1 n'avait jamais été identifié.

Précédemment, le Dr. Bachand avait réalisé une purification par affinité avec la protéine d'arginine méthyltransférase I (Rmt1) couplée à la spectrométrie de masse, ce qui a permis d'identifier l'homologue de PABPN1 (Pab2) chez la levure à fission. Différentes expériences ont démontré que Pab2 est une protéine nucléaire non-essentielle qui lie spécifiquement des séquences poly(A) *in vitro*. Pab2 a été identifiée par son interaction avec Rmt1 et cette enzyme méthyle les arginines présentes dans le domaine riche en arginine de la protéine Pab2. Cette modification post-traductionnelle n'affecte pas la localisation nucléaire et l'affinité aux séquences poly(A) de Pab2. Par contre, les niveaux d'oligomérisation de Pab2 sont nettement augmentés lorsque Pab2 n'est plus méthylée. De plus, les ARNs provenant de cellules $\Delta pab2$ sont hyperadénylés, ce qui corrobore avec la fonction de PABPN1 à contrôler la taille des queues poly(A) *in vitro*.

Par la suite, j'ai caractérisé l'implication de Pab2 durant la maturation du pré-ARNm. Des essais d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont établi que Pab2 est recrutée co-transcriptionnellement aux gènes activement transcrits. De façon surprenante, mes études ont démontré que le recrutement de Pab2 précède celui d'un facteur impliqué dans le clivage et la polyadénylation. De plus, le recrutement de Pab2 dépend de l'ARNm naissant. Conséquemment, j'ai voulu identifier les protéines associées à Pab2. Ainsi, une purification d'affinité par tandem couplée à la spectrométrie de masse a révélé que Pab2 est associée à plusieurs protéines ribosomales ainsi que des facteurs de traduction générale. Ces données étaient étonnantes puisque la traduction des ARNm implique la protéine Pab1. Par conséquent, il était pertinent de vérifier le rôle possible de Pab2 sur la traduction. À priori, j'ai confirmé que Pab2 fait la navette entre le noyau et le cytosol, ce qui concorde avec l'orthologue PABPN1. Par la suite, j'ai démontré qu'une fraction de la protéine Pab2 demeure associée aux ARNm activement traduits.

Il devenait alors intéressant de connaître les cibles de Pab2. L'analyse génomique a établi que Pab2 régule l'expression de certains transcrits, tels que les gènes méiotiques, les snoRNAs et les rétrotransposons. Pour la suite de mes recherches, je me suis concentrée sur le gène codant pour la protéine ribosomale de la large sous-unité Rpl30-2, dont l'expression augmente de 4 fois en absence de Pab2. Il est intéressant de noter que le changement d'expression de Rpl30-2 dans une souche $\Delta pab2$ dépend de la présence de l'intron Rpl30-2. Mes travaux démontrent que l'expression de Rpl30-2 est régulée au niveau du pré-ARNm par Pab2 et Rrp6, une composante de l'exosome nucléaire. De plus, l'analyse du transcriptome par *RNA-seq* a établi que ce mécanisme permet de réguler l'expression d'une soixantaine de gènes qui sont inefficacement épissés. En ce qui concerne Rpl30-2, l'épissage de ce transcrit est ralenti par Rpl30-1, le paralogue de Rpl30-2.

L'ensemble de mes travaux ont pu caractériser l'homologue de PABPN1 (Pab2) chez la levure à fission tout en établissant une fonction spécifique pour cette *poly(A)-binding protein*.

Mots-clés (5): *poly(A)-binding protein*, polyadénylation, méthylation, exosome, expression génique.

INTRODUCTION

1. TRANSCRIPTION

Le mécanisme de base de la transcription est identique chez tous les organismes où l'ADN est reconnu par l'ARN polymérase. L'activité de cette enzyme permet de polymériser des ribonucléotides libres pour générer une chaîne d'acide ribonucléique (ARN) (LEE et YOUNG, 2000; HAHN, 2004). Chez les eucaryotes, trois ARN polymérase (ARN Pol I-III) ont été identifiées au noyau et chacune d'elles diffèrent notamment par le nombre et le type de sous-unités. De plus, chaque ARN polymérase synthétise spécifiquement différentes classes d'ARN. Par exemple, l'ARN Pol I génère la plupart des ARN ribosomaux tandis que l'ARN Pol III synthétise les ARN de transfert, l'ARN ribosomal 5S et quelques petits ARNs (PAULE et WHITE, 2000).

Quant à la troisième enzyme, l'ARN Pol II transcrit les gènes encodant pour les protéines et génère la plupart des snRNAs. L'ARN Pol II est composée de 12 sous-unités (Rpb1-12) tant chez la levure que les eucaryotes. Pour la levure, le cœur de l'enzyme est constitué de trois polypeptides (Rpb1-3) et le gène *RPB1* code pour le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN Pol II (LEE et YOUNG, 2000). Le CTD est une plateforme servant au recrutement de plusieurs facteurs impliqués pour la maturation des pré-ARNm (PHATNANI et GREENLEAF, 2006). Il est à noter que le CTD est composé d'une série de répétitions hautement conservées de l'heptapeptide YSPTSPS où le nombre de répétitions varie entre les organismes, soit de 26 et de 52 répétitions pour la levure et les mammifères, respectivement (ALLISON *et al.*, 1988; PHATNANI et GREENLEAF, 2006).

La machinerie de transcription associée à l'ARN Pol II est la plus complexe et comporte une soixantaine de polypeptides. La transcription de l'ARN Pol II débute par le recrutement de l'enzyme à la région promotrice ainsi que plusieurs facteurs, tels que ceux modifiant la structure de la chromatine. Initialement, l'ARN Pol II reste inactive au promoteur et ne synthétise que de court brin d'ARN. L'activité de l'enzyme s'activera par un changement conformationnel et pourra, par la suite, transcrire activement les gènes (LEE et YOUNG, 2000; BENTLEY, 2002). L'élongation de la transcription est

caractérisée par un changement d'état de phosphorylation du CTD. Lors de l'initiation de la transcription, le CTD n'est pas phosphorylé, mais la sérine 5 de l'heptapeptide est phosphorylée au début de l'élongation permettant le recrutement des facteurs chargés d'ajouter la coiffe au pré-ARNm. Une fois cette étape de maturation complétée, la sérine 5 est déphosphorylée graduellement et la phosphorylation de la sérine 2 commence. La phosphorylation de la sérine 2 est graduelle durant l'élongation de la transcription et permet de recruter les facteurs requis pour l'épissage, le clivage et la polyadénylation (KOMARNITSKY *et al.*, 2000; HOCINE *et al.*, 2010) de même que les facteurs modifiant la chromatine et exportant les ARNm au cytosol. De plus, la phosphorylation de la sérine 7 de l'heptapeptide est importante lorsque l'ARN Pol II traverse une séquence intronique, ce qui suggère un rôle potentiel pour l'assemblage co-transcriptionnel ou la dissociation du spliceosome (KIM *et al.*, 2010). Des niveaux élevés de phosphorylation à la sérine 7 sont détectés aux régions promotrices des gènes codants (CHAPMAN *et al.* 2007). Aussi, une forte corrélation est observable entre le profil de recrutement de Nrd1 et l'état de phosphorylation de la sérine 7, suggérant que le recrutement de Nrd1 est stimulé par la phosphorylation de cette sérine (KIM *et al.*, 2010).

2. MATURATION DE L'ARNm

La maturation de l'ARNm consiste en une série d'étapes où l'ARN naissant est modifié pour devenir un ARN mature et fonctionnel. Pour l'ARNm, ces étapes sont l'ajout de la coiffe en 5', l'excision des séquences introniques par l'épissage et l'ajout d'une queue poly(A) en 3' du pré-ARNm (ZORIO et BENTLEY, 2004; HOCINE *et al.*, 2010). Chaque étape de maturation de l'ARNm nécessite l'assemblage de plusieurs complexes (Figure 1).

2.1 Coiffe

Tel que mentionné, l'ajout de la coiffe est une étape de maturation co-transcriptionnelle qui s'accomplit lorsque la taille de l'ARN naissant est d'environ 20-25 nt. La présence de la coiffe permet de stabiliser l'ARNm tout en le protégeant contre les exoribonucléases (SHATKIN et MANLEY, 2000; COUGOT *et al.*, 2004). Une des fonctions importantes de la coiffe est de stimuler la traduction de l'ARNm. Ainsi, la coiffe

s'associe au facteur d'initiation de traduction eIF4E et ce facteur interagit à eIF4G permettant de recruter le ribosome via eIF3 (SONENBERG et HINNEBUSCH, 2009). De même, la coiffe est essentielle pour l'épissage adéquat du pré-ARNm et cet aspect est élaboré à la section 4.1.

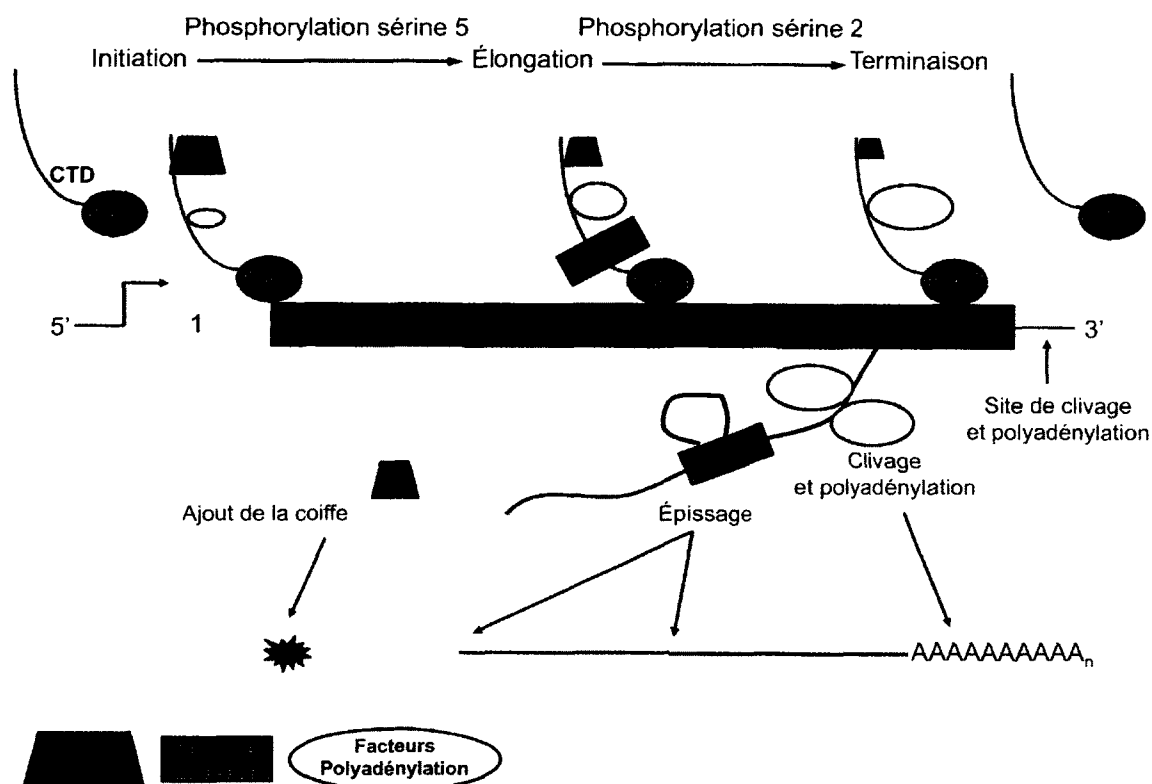


Figure 1. Représentation schématique de la maturation co-transcriptionnelle de l'ARNm.

Les facteurs impliqués pour la maturation de l'ARNm interagissent avec l'ARN Pol II via le domaine carboxy-terminal (CTD). Les enzymes spécifiques pour ajouter la coiffe au pré-ARNm sont recrutées au 5' du gène et l'ARN Pol II traverse le gène avec les facteurs requis pour l'épissage, le clivage et la polyadénylation. Le niveau de recrutement des différents facteurs est représenté par la taille des symboles. Les exons sont identifiés par des boîtes colorées et les introns sont représentés par les boîtes noires. L'étoile bleue correspond à la coiffe. Figure adaptée de ZORIO et BENTLEY, (2004).

De plus, chez les mammifères, la coiffe facilite le transport de certains ARNs au cytosol, dont les snRNAs (MONECKE *et al.*, 2009). La plupart des gènes codant pour les snRNAs, incluant le gène U1 snRNA, sont normalement transcrits par l'ARN Pol II et ces transcrits reçoivent une coiffe monométhylée (m^7G). Ces snRNAs sont rapidement exportés au cytosol où différentes protéines lieront ces transcrits pour former les snRNPs. La coiffe est, par la suite, modifiée afin d'être triméthylée ($m^{2,2,7}G$) permettant aux snRNPs de retourner au noyau pour participer à l'épissage des pré-ARNm. Pour confirmer ce rôle attribué à la coiffe, le gène U1 snRNA a été transcrit par l'ARN Pol III pour générer un transcrit non coiffé et celui-ci reste au noyau suggérant que la coiffe est importante pour l'export des snRNAs au cytosol (HAMM et MATTAJ, 1990). Chez la levure, les snRNAs peuvent aussi obtenir une coiffe triméthylée, mais cette modification à la coiffe se réalise au nucléole (MOUAIKEL *et al.*, 2002).

La coiffe est ajoutée aux pré-ARNm par une série d'étapes enzymatiques. Initialement, l'ARN triphosphatase clive le γ -phosphate de l'ARN naissant afin que la guanylyl-transférase puisse ajouter une guanosine sur l'extrémité 5' du pré-ARNm. Cette réaction génère la formation d'une liaison 5'-5' triphosphate tout en utilisant le GTP comme donneur. Par la suite, la 7'-méthyltransférase transfère le groupe méthyle provenant de la *S*-adénosylméthionine (AdoMet) sur le N7 de la guanosine (FURUICHI et SHATKIN, 2000; SHUMAN, 2001; HOCINE *et al.*, 2010).

2.2 Épissage

L'épissage consiste à exciser les introns afin de joindre les exons par deux étapes de transestérification effectuées par le spliceosome. Ce complexe macromoléculaire dynamique est composé de plusieurs protéines et de cinq snRNPs. Chaque snRNP est composé d'un snRNA (U1, U2, U4, U5 et U6) et de facteurs associés (KRUMMEL *et al.*, 2010). Certains éléments de la machinerie d'épissage reconnaissent sur les pré-ARNm des séquences consensus qui permettront d'orienter l'épissage. Ces séquences sont situées à la jonction exon/intron (5'ss), au site de branchement localisé dans l'intron (bp) et à la jonction intron/exon (3'ss). Quant à la région riche en pyrimidines, elle se localise entre le

site de branchement et la séquence 3'ss (Figure 2A). Chez plusieurs organismes, les séquences consensus 5'ss (GU) et 3'ss (AG) sont conservées, tout comme le résidu d'adénosine présent dans la séquence du site de branchement (KUHNS et KÄUFER, 2003).

Le mécanisme général d'épissage est conservé de la levure à l'homme. Le spliceosome s'assemble sur les séquences introniques des pré-ARNm de façon séquentielle avec l'aide de l'ARN Pol II (JURICA et MOORE, 2003; TARDIFF et ROSBASH, 2006; WAHL *et al.*, 2009) (Figure 2B). Il a été établi que la délétion partielle ou totale du CTD de l'ARN Pol II entraîne un épissage peu efficace chez les mammifères (McCRACKEN *et al.*, 1997). Initialement, le complexe E s'assemble par l'association de U1 snRNP à la séquence 5'ss, les facteurs auxiliaires du U2 (U2AF65/35) à la séquence riche en pyrimidines et le facteur SF1 au site de branchement. Par la suite, U2 snRNP lie le site de branchement engendrant la dissociation du facteur SF1 pour ainsi créer le complexe A. U4 et U6 snRNP s'associent par un long appariement de nucléotides tandis que U5 snRNP rejoint le U4/U6 par des interactions protéiques pour former le tri-snRNP. L'association du tri-snRNP au complexe A et le relâchement des facteurs auxiliaires de U2 (U2AF65/35) génèrent le complexe B qui correspond au complexe pré-catalytique. Ce complexe, tout particulièrement U5 snRNP, favorise le rapprochement des extrémités de l'intron à exciser. Ce changement conformationnel de l'ARN entraîne le départ de U4 snRNP et le remplacement de U1 snRNP par U6 snRNP pour créer le complexe B*, soit le spliceosome activé. Ainsi, la première réaction de transestérification est catalysée lorsque U6 et U2 snRNP s'apparient. Cette réaction chimique est une attaque nucléophile du 2'OH du ribose de l'adénosine présente au site de branchement sur le phosphate de la jonction exon/intron en 5' de l'intron engendrant la coupure de l'intron. La deuxième réaction de transestérification se poursuit lorsque le 3'OH libéré au niveau de l'exon en amont attaque le phosphate de la jonction intron/exon en aval de l'intron (complexe C). Ainsi, l'intron, appelé lariat, est excisé et les deux exons sont correctement ligués permettant la dissociation du spliceosome. Le lariat relâché est réouvert par une enzyme de débranchement (Dbr1) afin de rendre le brin d'ARN accessible à la dégradation.

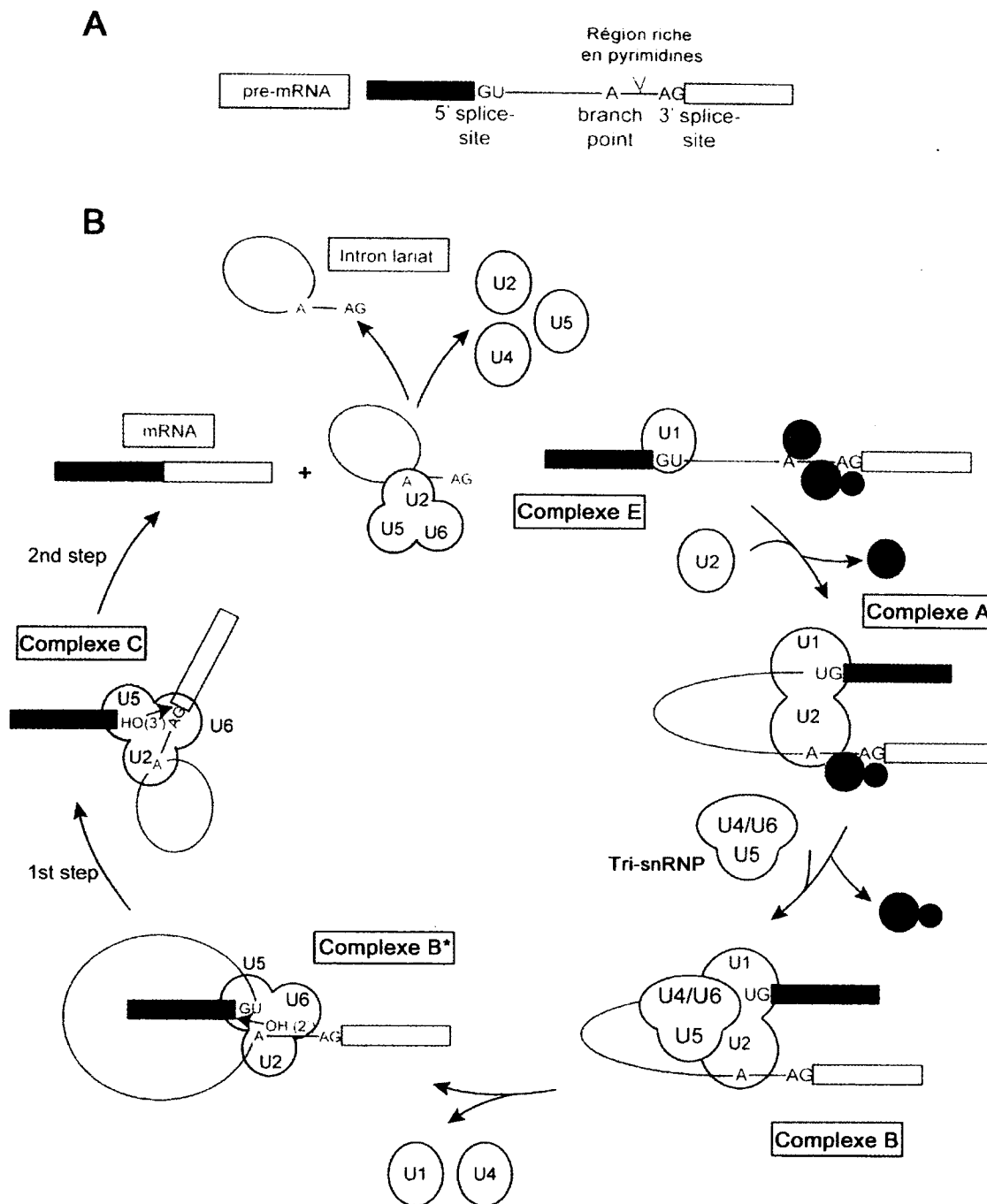


Figure 2. L'épissage du pré-ARNm par le spliceosome.

Les exons sont identifiés par des boîtes de couleurs et les introns par des lignes bleues. Les différents snRNPs sont représentés par des cercles. Les deux réactions de transestérification sont démontrées par le schéma en rouge. Figure adaptée de WAHL *et al.*, (2009) et KRUMMEL *et al.*, (2010).

Il faut mentionner que le centre catalytique du spliceosome n'est pas très bien caractérisé. Certaines évidences suggèrent que l'épissage du pré-ARNm est accompli par des protéines qui assistent la catalyse produite par l'ARN (SHI *et al.*, 2006; MATHEW *et al.*, 2008). Il semblerait que le centre catalytique inclurait du magnésium et le U6 snRNA. Ainsi, des mutations et des modifications à cet ARN entraîneraient l'arrêt complet de l'épissage (SONTHEIMER *et al.*, 1997; YEAN *et al.*, 2000; NILSEN, 2000). D'un autre côté, un nombre important de facteurs d'épissage sont essentiels pour la viabilité cellulaire et pour l'épissage *in vitro*. Ces facteurs joueraient un rôle important pour le réarrangement du spliceosome (SMITH *et al.*, 2008). De plus, le domaine RNaseH de Prp8 aiderait à assembler et à stabiliser le centre catalytique du spliceosome tout en ayant la possibilité de participer à la réaction chimique de l'épissage (PENA *et al.*, 2008).

Tout au long de l'épissage, les interactions entre le pré-ARNm et les snRNAs passent par des appariements de séquences complémentaires. Par exemple, le U2 snRNA contient une séquence complémentaire à la séquence du site de branchement. Ce type d'appariement laisse le résidu d'adénosine non apparié afin qu'il demeure disponible pour l'attaque nucléolytique lors de la première réaction de transestérification. Il existe également des appariements ARN-ARN entre les différents snRNAs, notamment l'association entre U2 snRNA et U6 snRNA (NILSEN, 1998; STALEY et GUTHRIE, 1998; WAHL *et al.*, 2009).

À des fins de statistiques, 43% des gènes contiennent des introns chez *S. pombe*, dont plusieurs gènes ont plus qu'un intron. La longueur des séquences introniques varie entre 40 et 75 nt pour 85% des introns. Par contre, chez *S. cerevisiae*, seulement 5% des gènes contiennent des introns et la plupart d'entre eux n'ont qu'un seul intron situé en 5' du pré-ARNm. Contrairement à *S. pombe*, la taille moyenne des introns chez *S. cerevisiae* est de 270 nt (WOOD *et al.*, 2002).

2.3 Clivage et polyadénylation

La polyadénylation du pré-ARNm est un processus en deux étapes qui consistent à un clivage endonucléolytique et à l'ajout d'une queue poly(A) sur le pré-ARNm. Ces deux

étapes sont intimement liées; si le transcrit n'est pas clivé, il ne sera pas polyadénylé et si le transcrit est clivé sans être polyadénylé, le transcrit sera dégradé.

La taille moyenne des queues poly(A) des ARNm est spécifique à l'espèce, soit de 250, 70 et 40 nt chez les humains, *S. cerevisiae* et *S. pombe*, respectivement. Pour l'instant, toutefois, le mécanisme moléculaire qui contrôle la taille des queues poly(A) n'est pas clairement compris chez les différentes espèces (MANGUS *et al.*, 2003).

2.3.1 Description du mécanisme

Chez les eucaryotes, des éléments de séquences permettent de cibler spécifiquement le site de clivage et de polyadénylation. Par contre, les séquences et les facteurs protéiques requis pour la polyadénylation ne sont pas les mêmes d'un organisme à l'autre (MANDEL *et al.*, 2008; MILLEVOI et VAGNER, 2010). Par conséquent, cette section sera séparée en deux, soit une première section spécifique pour les mammifères et d'une deuxième pour la levure *S. cerevisiae*.

2.3.1.1 Chez les mammifères

Les pré-ARNm contiennent trois éléments qui définissent la séquence primaire de clivage et de polyadénylation, soit l'hexamère AAUAAA, le site de clivage et l'élément GU-riche (DSE) (Figure 3). La séquence AAUAAA, hautement conservée, se retrouve à 10-30 nt en amont du site de clivage. La variante la plus commune pour cette séquence est AUUAAA, sinon très peu de variantes sont observables. Habituellement, des mutations introduites à cette séquence par mutagenèse dirigée entraînent son inactivation. La séquence DSE se positionne à 20-40 nt en aval du site de clivage (MILLEVOI et VAGNER, 2010). De plus, deux éléments de séquences auxiliaires peuvent stimuler et réguler cette réaction (ZHAO *et al.*, 1999; MANDEL *et al.*, 2008). L'un des éléments est situé en amont de l'hexamère et ne possède pas de séquence consensus, mais il est souvent constitué d'élément U-riche (USE). L'efficacité du clivage et de la polyadénylation est renforcée par la présence de l'élément USE parce qu'il favorise la liaison de facteurs de polyadénylation au site de clivage (BRACKENRIDGE et PROUDFOOT, 2000). Le second

élément pouvant stimuler le clivage se situe en aval de la séquence DSE et est généralement G-riche.

Le facteur CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) est le joueur principal pour cette étape de maturation puisqu'il est impliqué tant pour le clivage que pour la polyadénylation du pré-ARNm. Ce facteur lie directement la séquence AAUAAA et comprend cinq sous-unités. Le CstF (*cleavage stimulation factor*) est constitué de trois sous-unités qui s'associent à l'élément DSE. Comme son nom l'indique, ce facteur stimule le clivage et il n'est pas essentiel pour la polyadénylation du pré-ARNm (TAKAGAKI *et al.*, 1990; DANCKWARDT *et al.*, 2008).

Les facteurs CPSF et CstF interagissent afin de stabiliser leurs associations à l'ARNm. L'efficacité de clivage et de polyadénylation se reflète par la stabilité de l'interaction entre CPSF et CstF (WAHLE, 1995a; PROUDFOOT, 2011). Les facteurs du complexe CFI_m/II_m (*cleavage factor III*) interagissent avec CPSF et sont requis lors du clivage du pré-ARNm tout en étant dispensables pour la polyadénylation. Il a été démontré que la réaction de clivage est inhibée lorsqu'une protéine des facteurs CFI_m ou CFII_m est déphosphorylée par une Ser/Thr phosphatase (RYAN, 2007).

La poly(A) polymérase (PAP) est l'enzyme qui catalyse l'ajout de résidu d'adénosine pour générer la queue poly(A). La PAP est un polypeptide monomérique qui lie non spécifiquement et très faiblement l'ARN. Par contre, la PAP stabilise la liaison de CPSF à l'ARN et par conséquent, la PAP est attachée à l'ARN par CPSF (KAUFMANN *et al.*, 2004). L'activité enzymatique de la PAP utilise l'ATP comme précurseur d'adénosine et s'effectue de la même manière que celle de l'ARN Pol II, sans toutefois avoir recours à une matrice d'ADN. De plus, il existe plusieurs isoformes de la PAP et ceux-ci sont générés par l'épissage alternatif et la polyadénylation alternative (ZHAO et MANLEY, 1996; LEE *et al.*, 2000). La PAP I et la PAP II diffèrent seulement par le domaine C-terminal et sont toutes les deux enzymatiquement actives. Toutefois, PAP II est l'isoforme prédominant chez les différentes espèces. Les isoformes courts de la PAP (PAP III, PAP IV et PAP V)

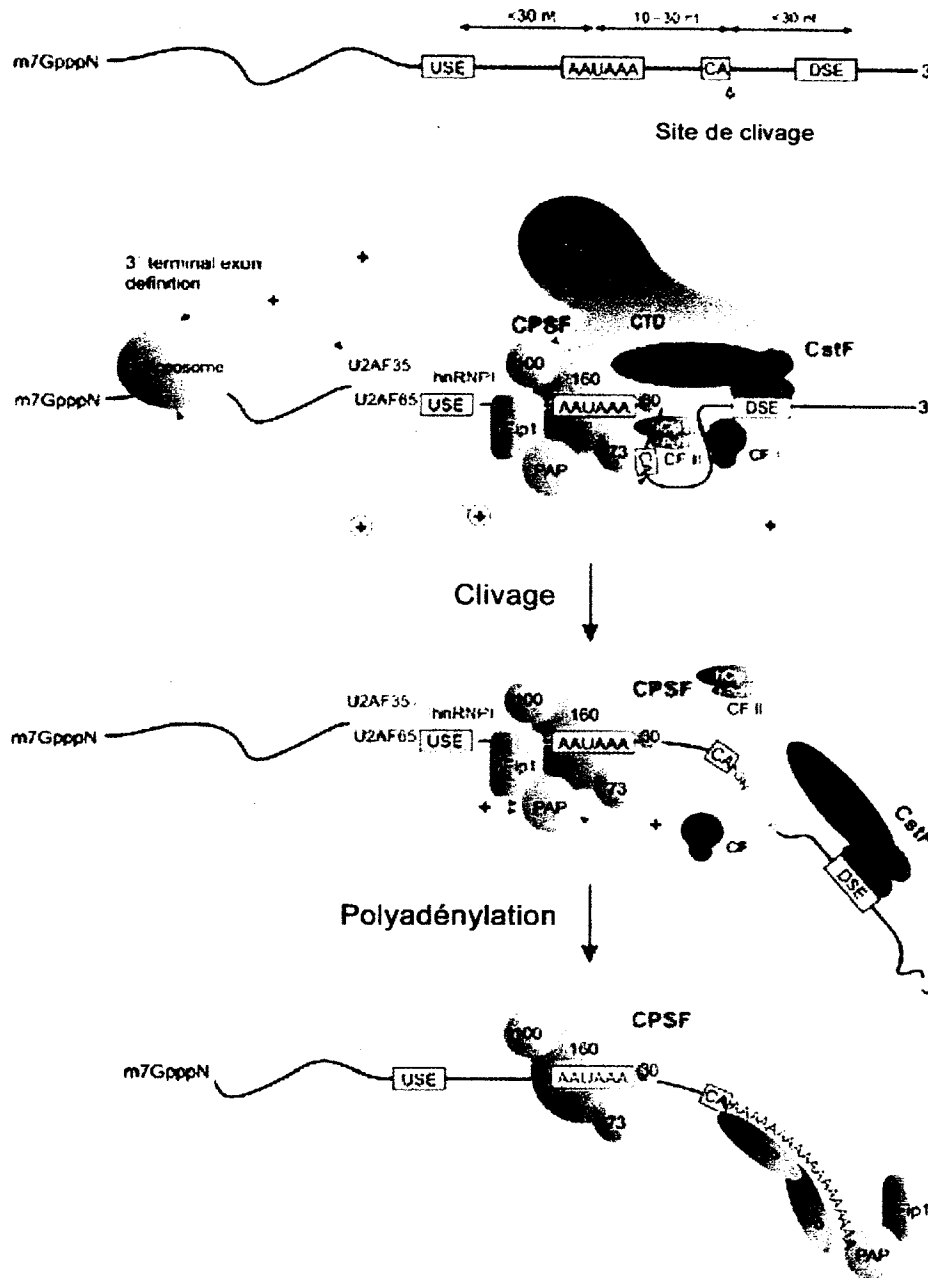


Figure 3. Représentation schématique du clivage et de la polyadénylation chez les mammifères.

Le complexe spécifique au clivage s'assemble via une liaison de CPSF à la séquence AAUAAA et CstF à l'élément DSE. Après la réaction de clivage, les facteurs CstF et CFI_m/II_m quittent le complexe et la PAP synthétise une courte queue poly(A). La présence de PABPN1 à la queue poly(A) permet de stimuler la processivité de la PAP. Figure adaptée de DANCKWARDT *et al.*, (2008).

n'ont pas la séquence NLS, sont enzymatiquement inactifs et leurs fonctions sont plus ou moins caractérisées (RAABE *et al.*, 1991; ZHAO et MANLEY, 1996). Le dernier élément important pour l'étape de polyadénylation est la protéine PABPN1, soit une protéine liant la queue poly(A). Toutes les fonctions relatives à la protéine PABPN1 seront approfondies à la section 8.2.

Les facteurs CPSF et CstF sont recrutés par le CTD de l'ARN Pol II durant la transcription. Lorsque l'hexamère AAUAAA est transcrit en ARN, le CPSF transfère sur cette séquence tandis que le CstF lie l'élément DSE pour former un complexe stable. Par la suite, le complexe CFI_m/II_m lie l'ARN tandis que la PAP s'associe à CPSF. Toutes ces protéines avec l'aide du CTD de l'ARN Pol II permettent de cliver le pré-ARNm. Lorsque les facteurs CstF et CFI_m/II_m quittent le complexe, la polyadénylation débute immédiatement. Ainsi, la PAP avec la collaboration de CPSF synthétise une courte queue poly(A) d'environ 10 nt. À cette étape, PABPN1 s'associe à la queue poly(A) afin de stimuler la processivité de la PAP pour obtenir une queue poly(A) d'environ 250 nt (DANCKWARDT *et al.*, 2008; PROUDFOOT, 2011) (Figure 3).

Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées afin de comprendre davantage l'implication de certains facteurs lors de la polyadénylation. Il a été démontré qu'une polyadénylation efficace de l'ARNm nécessite la présence de trois composantes : CPSF, PABPN1 et PAP. Séparément, CPSF et PABPN1 stimulent modestement la processivité de PAP. Toutefois, une réaction rapide et processive de polyadénylation se produit lorsque CPSF et PABPN1 sont combinés avec la PAP (WAHLE, 1991 et 1995b). Ces évidences ont conduit à un modèle où CPSF et PABPN1 coopèrent au recrutement et à la stabilisation de PAP au substrat d'ARN. Des essais de polyadénylation *in vitro* ont établi que la taille des queues poly(A) est d'environ 250 nt lorsque ces trois facteurs sont réunis et cette taille est identique à celle synthétisée *in vivo* chez les mammifères. L'interruption de la polyadénylation serait médiée par la déstabilisation du complexe ternaire (CPSF-PABPN1-PAP) (Figure 11). En effet, la formation sphérique de la queue poly(A) avec PABPN1 assure le contact entre CPSF et PAP. Toutefois, l'ajout supplémentaire de PABPN1 sur la queue poly(A) n'est plus possible lorsque cette structure excède plus de 250 résidus

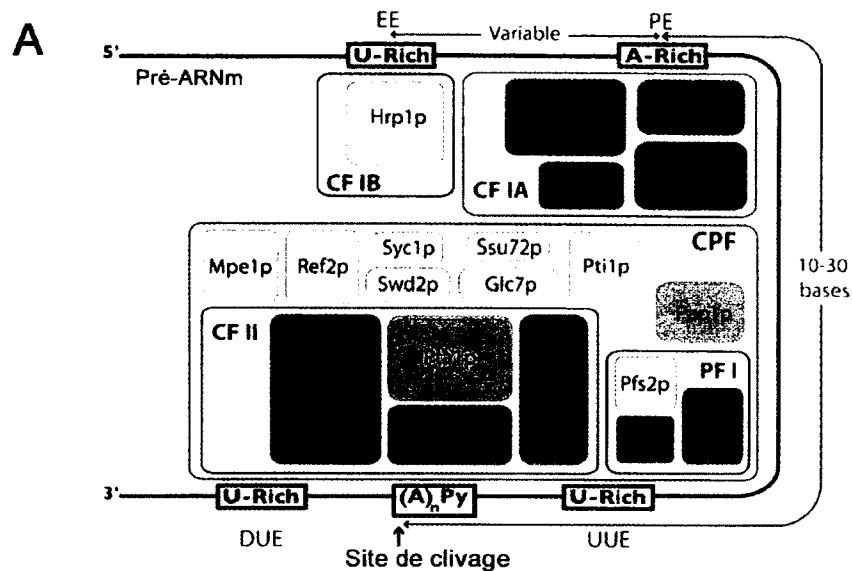
d'adénosine, ce qui déstabilise le complexe. Ainsi, la perte d'interaction entre CPSF et PAP se répercute par la perte de processivité de cette enzyme et l'arrêt de la polyadénylation (KÜHN *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Chez la levure (*S. cerevisiae*)

L'analyse des séquences impliquées dans le clivage et la polyadénylation est beaucoup plus compliquée puisqu'il n'y a pas de séquences hautement conservées. Il existe, tout de même, quatre éléments de séquence qui sont importants, notamment l'élément de positionnement (PE), l'élément d'efficacité (EE), le site de clivage (PyA_n) et les éléments U-riche situés de part et d'autre du site de clivage (MANDEL *et al.*, 2008) (Figure 4A).

L'élément de positionnement se localise à environ 10-30 nt en amont du site de clivage. Le PE est constitué d'une séquence A-riche et les séquences les plus efficaces sont AAUAAA ou AAAAAA (GUO et SHERMAN, 1996; MANDEL *et al.*, 2008). La plupart des mutations dans le PE perturbent la position du clivage sans affecter l'efficacité du clivage et de la polyadénylation. Le clivage survient préférentiellement à une séquence PyA_n (MILLEVOI et VAGNER, 2010) tout en étant stimulé par l'élément d'efficacité qui se situe en amont de l'élément de positionnement à une distance variable. La séquence de EE est AU-riche et parmi les nombreuses séquences, UAUUA correspond à la séquence optimale qui est impliquée pour 52% des transcrits (GUO *et al.*, 1995). Alors que la séquence EE améliore l'efficacité, celle-ci n'est pas essentielle pour le clivage (MANDEL *et al.*, 2008). Les éléments U-riche de part et d'autre du site de clivage (UUE et DUE) sont obligatoires pour l'activité de clivage (DICHTL et KELLER, 2001).

Tous les facteurs requis pour le clivage et la polyadénylation du pré-ARNm sont des protéines essentielles (ZHAO *et al.*, 1999). Le complexe de clivage et de polyadénylation présent chez la levure est différent de celui des mammifères, mais il existe tout de même des similitudes significatives. Ainsi, les complexes protéiques associés à cette machinerie incluent le facteur de clivage et de polyadénylation (CPF), le facteur de clivage IA (CFIA)



B

Facteur chez les mammifères (Facteur chez la levure)	Protéine chez les mammifères	Homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i>
CPSF (CPF)	CPSF-160	Cft1 / Yhh1
CPSF (CPF)	CPSF-100	Cft2 / Yhh1
CPSF (CPF)	CPSF-73	Brr5 / Ysh1
CPSF (CPF)	CPSF-30	Yth1
CPSF (CPF)	hFip1	Fip1
CstF (CFIA)	CstF-77	Rna14
CstF (CFIA)	CstF-64	Rna15
CstF	CstF-50	-
CFI _m	CFI _m -25kD	-
CFI _m	CFI _m -68kD	-
CFII _m (CFIA)	hPcf11	Pcf11
CFII _m (CFIA)	hClp1	Clp1
(CPF)	Symplekin	Pta1
	PAP	Pap1
	PABPN1	Pab1

Figure 4. Représentation schématique de la machinerie de clivage et de la polyadénylation chez la levure *S. cerevisiae*.

(A) Les différents facteurs associés à leurs séquences respectives lors du clivage et la polyadénylation du pré-ARNm. EE: élément d'efficacité; PE: élément de positionnement; UUE: élément U-riche en amont du site de clivage; DUE: élément U-riche en aval du site de clivage. (B) Un tableau énumérant les facteurs homologues entre la levure *S. cerevisiae* et les mammifères. Figure adaptée de MANDEL *et al.*, (2008).

et le facteur de clivage IB (CFIB) comprenant uniquement le facteur Hrp1 (MILLEVOI et VAGNER, 2010). Il faut mentionner qu'Hrp1 n'est pas requis pour le clivage, mais plutôt pour la sélection adéquate du site de clivage (MINVIELLE-SEBASTIA *et al.*, 1998; KIM GUIBERT *et al.*, 2007). Le facteur CPF inclus, entre autres, la poly(A) polymérase (Pap1), le facteur de clivage (CFII) et le facteur de polyadénylation (PFI). Le facteur CFII contient des sous-unités qui sont homologues à ceux du facteur CPSF tandis que le facteur CFIA contient des sous-unités homologues à ceux du CstF et CFII_m (MANDEL *et al.*, 2008). Tous les facteurs homologues entre la levure et les mammifères sont énumérés dans la figure 4B.

La reconstruction de la réaction de clivage *in vitro* ne nécessite que CF1A, CFIB et CFII tandis que la polyadénylation *in vitro* requiert CPF, CFIA, CFIB et Pap1 (CHEN et MOORE, 1992). Tout d'abord, le complexe CPF reconnaît le site de clivage par des interactions de Yhh1, Ydh1 et Yth1 aux séquences adjacentes au site de clivage (DICHTL *et al.*, 2002b; KYBURZ *et al.*, 2003). Hrp1 (CFIB) lie EE et son affinité à interagir avec Rna14 permet de recruter le facteur CFIA à PE (MANGUS *et al.*, 2004a). Subséquent au clivage, le facteur Fip1, sous-unité de CPF, recrute la poly(A) polymérase afin de synthétiser une longue queue poly(A). Rapidement, Pab1 recouvre la queue poly(A) et recrute le complexe de déadénylation PAN (MANGUS *et al.*, 2004b). L'étape de déadénylation permettra de réduire la longue queue poly(A) à une taille d'environ 70 nt.

Le mécanisme de polyadénylation chez *S.pombe* ressemblerait beaucoup plus à celui retrouvé chez *S. cerevisiae* qu'à celui des mammifères. Tout d'abord, la séquence de la poly(A) polymérase de *S. pombe* (Pla1) est d'une grande homologie avec celle de *S. cerevisiae* (Pap1) pour les 400 premiers acides aminés (64% identique). De plus, la souche $\Delta pap1$ est létale, mais ce phénotype n'est plus observable lorsque la Pla1 est exprimée dans cette souche (OHNACKER *et al.*, 1996). Des essais *in vitro* ont démontré que la Pla1 ajoute une queue poly(A) sur des transcrits clivés lorsque cette enzyme est en présence des facteurs de polyadénylation de *S. cerevisiae*. La taille des queues poly(A) de ces transcrits est similaire à celle observée lorsque ces transcrits sont polyadénylés avec tous les facteurs de *S. cerevisiae* (OHNACKER *et al.*, 1996). De plus, aucune

polyadénylation de transcrits n'est observable *in vitro* lorsque la Pla1 est en présence des facteurs de polyadénylation spécifiques des mammifères (OHACKER *et al.*, 1996). D'autre part, les signaux de clivage et de polyadénylation peuvent être interchangeables entre les souches de levure *S. pombe* et *S. cerevisiae* (HUMPHREY *et al.*, 1991).

2.3.2 Fonctions

Tout comme la coiffe, la présence de la queue poly(A) sur l'ARNm permet de le protéger contre les machineries de dégradation, notamment les 3'→5' exoribonucléases. De plus, la taille des queues poly(A) influence l'efficacité de traduction. Ainsi, des ARNm ayant de longues queues poly(A) seront plus efficacement traduits que les transcrits ayant de courtes queues poly(A) (BEILHARZ et PREISS, 2007; LACKNER *et al.*, 2007). Aussi, le clivage et la polyadénylation sont des événements influençant l'efficacité d'export des ARNm (QU *et al.*, 2009). Par exemple, des mutations à la poly(A) polymérase et à des sous-unités du facteur CFIA, tels que Rna14, Rna15 et Pcf11 se répercutent par la rétention des ARNm au noyau (HAMMELL *et al.*, 2002). De plus, le facteur Pcf11 aide à recruter directement Yra1 sur l'ARNm, soit une composante requise pour le complexe TREX (JOHNSON *et al.*, 2009). Conformément à ces observations, des mutations à certains facteurs impliqués pour l'export des ARNm (Mex67 et Dbp5) engendrent l'hyperadénylation des transcrits (HAMMELL *et al.*, 2002). Par conséquent, la queue poly(A) des transcrits doit avoir une taille appropriée pour qu'ils soient exportés au cytosol (FUKE et OHNO, 2008). Le processus d'export des ARNm est décrit à la section 5.

3. TERMINAISON DE LA TRANSCRIPTION

La terminaison de la transcription est une étape importante pour prévenir la transcription inadéquate des séquences en aval du gène tout en recyclant l'ARN Pol II. Contrairement à l'ARN Pol I, à l'ARN Pol III ou à l'ARN polymérase des procaryotes, l'ARN Pol II n'arrête pas de transcrire à une position précise en réponse à un signal présent à la séquence d'ADN ou d'ARN (HENKIN, 2000; RICHARD et MANLEY, 2009). Cette distinction de l'ARN Pol II est probablement une adaptation de l'enzyme pour synthétiser de longs pré-ARNm. Actuellement, deux modèles de terminaison de la transcription de

l'ARN Pol II sont proposés, soit le modèle allostérique et le modèle torpedo. Il y a des évidences scientifiques pour les deux modèles, mais un modèle hybride entre les deux est proposé.

3.1 Modèle allostérique

Le modèle allostérique propose que l'ARN Pol II est altérée par un changement de conformation ou par la perte de facteurs anti-terminaison lorsque le site de clivage et de polyadénylation est reconnu (Figure 5A). Cette reconnaissance entraîne la perte de processivité de l'ARN Pol II de même que la terminaison graduelle de la transcription (ROSONINA *et al.*, 2006). Il est à noter que le clivage du pré-ARNm n'est pas un pré-requis pour ce modèle.

Un des facteurs anti-terminaison proposés est la protéine Sub1 chez *S. cerevisiae* et ce facteur serait un antagoniste à l'activité de terminaison de Rna15. De plus, Npl3 possède probablement l'activité anti-terminatrice puisque cette protéine compétitionne avec les facteurs de clivage et de polyadénylation (BUCHELI et BURATOWSKI, 2005). Ainsi, Sub1 et Npl3 sont libérés après la transcription du signal de clivage et de polyadénylation, ce qui permet de diminuer les activités anti-terminatrices au complexe d'élongation de l'ARN Pol II. Aussi, il a été démontré chez *S. cerevisiae* que la protéine Ssu72 affecterait la vitesse d'élongation de l'ARN Pol II durant l'élongation et la terminaison de la transcription (DICHTL *et al.*, 2002a). Chez *S. pombe*, les facteurs de remodelage de la chromatine Hrp1/Chd1 seraient impliqués dans la formation de structures spécifiques à la chromatine aux régions terminatrices. Ce changement de conformation à la chromatine est une condition nécessaire à l'efficacité de la terminaison de l'ARN Pol II (ALÉN *et al.*, 2002).

3.2 Modèle torpedo

L'ARN Pol II transcrit l'ADN pour générer un pré-ARNm qui sera clivé au site de clivage et de polyadénylation. Lorsque le pré-ARNm est clivé, l'ARN Pol II continue de transcrire l'ADN pour générer un ARN naissant non coiffé ayant un 5' PO₄. Le modèle

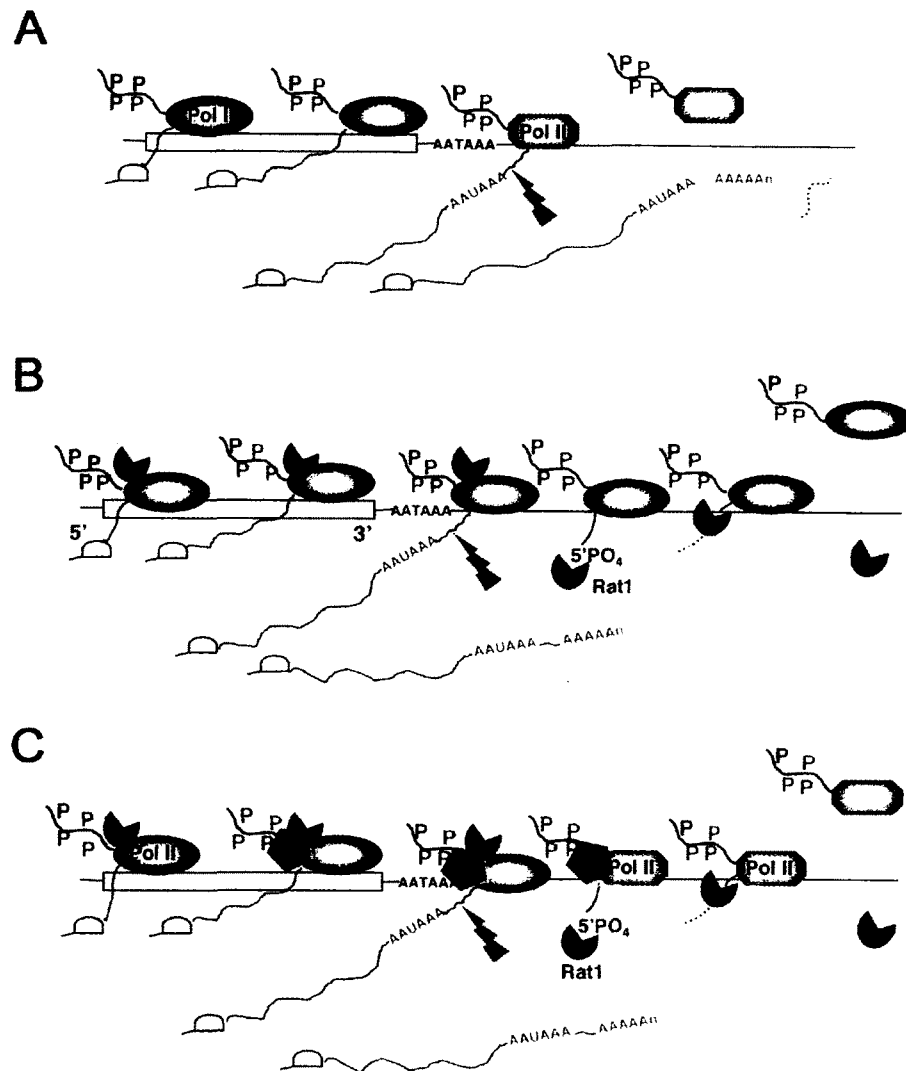


Figure 5. Représentation schématique des modèles de terminaison proposés.

(A) Modèle allostérique. Durant l'élongation de la transcription, l'ARN Pol II a une conformation processive (ovale vert). Cette conformation de l'enzyme est modifiée pour un statut non-processif lorsque le signal de clivage est détecté (octogone rouge). (B) Modèle torpedo. L'ARN généré après le site de clivage et de polyadénylation (ligne bleue) est digéré par l'exoribonucléase Rat1. Cette enzyme est recrutée par le CTD de l'ARN Pol II et son action permet de dissocier l'ARN Pol II de l'ADN. (C) Modèle hybride entre allostérique et torpedo. L'exoribonucléase Rat1 coopère avec des effecteurs allostériques (Pcf11) pour moduler la conformation de l'ARN Pol II, soit d'une conformation processive à non-processive. Figure adaptée de LUO et BENTLEY, (2004) et LUO *et al.*, (2006).

torpedo propose que l'ARN naissant est reconnu et dégradé par une 5'→3' exoribonucléase nommée Rat1 (XRN2, chez l'humain). L'activité processive de Rat1 est plus rapide que celle de l'ARN Pol II, ce qui engendre le décrochement de l'ARN Pol II de l'ADN lorsque Rat1 rejoint la polymérase et, par conséquent, la terminaison de la transcription (LUO et BENTLEY, 2004) (Figure 5B).

Plus concrètement, Rat1 interagit avec l'ARN Pol II par le biais de la protéine Rtt103 qui s'associe spécifiquement à la sérine 2 phosphorylée du CTD de l'ARN Pol II (KIM *et al.*, 2004b). De plus, Rat1 interagit avec une protéine non-essentielle Rai1 qui stimule *in vitro* l'activité de Rat1 (XUE *et al.*, 2000). Ainsi, le complexe Rat1/Rai1/Rtt103 se retrouve initialement associé au CTD de l'ARN Pol II pour que Rat1/Rai1 soit transféré sur l'ARN naissant afin de le dégrader tout en permettant le relâchement de l'ARN Pol II.

Le groupe de Buratowski a démontré que Rat1 est une enzyme essentielle pour la terminaison de la transcription. Par conséquent, une mutation ponctuelle (D235A) au résidu conservé pour l'activité enzymatique de Rat1 provoque une terminaison inadéquate du transcrit. Cette observation n'est pas occasionnée par l'absence de la protéine Rat1 (D235A) puisque le niveau d'expression de ce mutant est comparable à la protéine endogène (KIM *et al.*, 2004b).

Une solide évidence en faveur du modèle torpedo provient de l'analyse de différents mutants inhibant le clivage et/ou la polyadénylation du pré-ARNm sur la terminaison de la transcription. Un effet négatif sur la terminaison est observable lorsque les mutants inhibent les étapes de clivage et de polyadénylation tandis que peu ou aucun effet n'est détecté sur la terminaison lorsque les mutants interfèrent uniquement avec la polyadénylation (BIRSE *et al.*, 1998). Cette analyse suggère que le clivage du transcrit est un pré-requis pour observer une terminaison adéquate.

3.3 Modèle hybride entre allostérique et torpedo

Certaines évidences supplémentaires permettent de proposer un modèle hybride afin de réconcilier les modèles allostérique et torpedo. Une meilleure caractérisation de Rat1 démontre que cette enzyme est requise pour la terminaison de la transcription, mais aussi pour le clivage et la polyadénylation. En effet, Rat1 stimule la terminaison de la transcription par le recrutement de facteurs impliqués pour le clivage et la polyadénylation, notamment Pcf11 et Rna15. Il a été établi que les facteurs Pcf11 et Rna15 sont intimement liés à Rat1. Ainsi, un mutant de Pcf11 inhibe fortement le recrutement de Rat1 au site de polyadénylation et inversement, un mutant de Rat1 affecte négativement le recrutement de Pcf11 et Rna15 à cette séquence (LUO *et al.*, 2006).

De plus, la dégradation de l'ARN naissant par Rat1 ne semble pas être suffisante pour entraîner le relâchement de l'ARN Pol II de l'ADN (LUO *et al.*, 2006). Cette évidence contredit les résultats de Buratowski qui montraient l'importance de l'activité d'enzymatique de Rat1 lors de la terminaison de la transcription avec le mutant D235A (KIM *et al.*, 2004b). Selon les nouvelles informations obtenues par LUO *et al.*, (2006), le résultat de Buratowski démontrant la pertinence de l'activité enzymatique de Rat1 lors du relâchement de l'ARN Pol II est possiblement négatif puisqu'il pourrait être causé par d'autres facteurs (comme Pcf11) qui sont incapables de se localiser correctement sur le gène transcrit.

Un autre point à soulever est que le clivage du pré-ARNm ne semble pas être un pré-requis pour observer la terminaison de la transcription (TRAN *et al.*, 2001; OSHEIM *et al.*, 2002; SADOWSKI *et al.*, 2003). De plus, le complexe de transcription est déstabilisé par l'association du domaine CID de Pcf11 au CTD de l'ARN Pol II quand la sérine 2 est phosphorylée (SADOWSKI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005). Ainsi, Pcf11 est un facteur essentiel pour le clivage et la polyadénylation tout en étant un effecteur allostérique pour la terminaison de la transcription.

Le modèle hybride proposé implique la stimulation du clivage du pré-ARNm par Rat1 et par les facteurs conventionnels de clivage, notamment Pcf11. Le clivage est possiblement un pré-requis pour la terminaison de la transcription, mais jusqu'à présent, l'importance du clivage est contradictoire. L'ARN Pol II continue de transcrire l'ADN après le site de clivage et de polyadénylation tout en changeant de conformation et l'ARN naissant est dégradé par Rat1. Ainsi, le changement conformationnel de l'ARN Pol II et l'action conjointe de Rat1 permettent de relâcher l'ARN Pol II de l'ADN (LUO *et al.*, 2006) (Figure 5C).

Avec toutes ces évidences, il semble peu probable qu'un seul mécanisme de terminaison existe pour l'ARN Pol II. En effet, l'analyse des chromosomes de la drosophile par microscopie électronique a permis d'observer différents modes de terminaison (OSHEIM *et al.*, 2002). Pour la plupart des gènes, la terminaison se réalise par un arrêt brutal de l'ARN Pol II sans détecter le clivage du pré-ARNm et cette observation est plus compatible avec le modèle allostérique. Par contre, d'autres gènes montrent clairement des transcrits clivés restant associés à l'ARN Pol II et ces gènes continuent à être transcrit après le site de clivage et de polyadénylation, ce qui supporte le modèle torpedo (OSHEIM *et al.*, 2002).

4. INTERRELATION ENTRE LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE MATURATION DE L'ARNm

Plusieurs études ont montré des interrelations entre les différentes étapes de maturation de l'ARNm permettant de générer correctement l'ARNm.

4.1 Coiffe et épissage

Les premières évidences d'interrelation entre la coiffe et l'épissage ont été caractérisées *in vitro*. Initialement, le transcrit coiffé de la β -globine est efficacement épissé en présence d'un extrait cellulaire HeLa. Par contre, ce même transcrit non coiffé peut être épissé, mais l'efficacité d'épissage est diminuée de moitié par rapport au transcrit coiffé.

De plus, ce transcrit non coiffé génère des intermédiaires d'épissage aberrants qui ne sont pas détectables lorsque ce transcrit est correctement coiffé (KRAINER *et al.*, 1984). Parallèlement à ce point, des mutants thermosensibles de la guanylyl-transférase Cegl entraînent une inhibition rapide de l'ajout de la coiffe tout en affectant négativement l'épissage (SCHWER et SHUMAN, 1996).

Il a été démontré *in vitro* que différents analogues de la coiffe inhibent fortement l'épissage d'un transcrit suggérant que des facteurs reconnaissant la coiffe sont requis pour assembler correctement les complexes impliqués dans la maturation du pré-ARNm (KONARSKA *et al.*, 1984; COWLING, 2010). Selon cette proposition, l'épissage d'un substrat est favorisé par le CBC (*cap-binding complex*) nucléaire, soit deux protéines liant la coiffe (CBP80 et CBP20). En effet, ce type de liaison protéique facilite l'assemblage du spliceosome par l'association de U1 snRNP à la séquence 5'ss. Ainsi, le CBC nucléaire interagit avec des composantes du spliceosome afin de reconnaître efficacement le 5'ss de l'intron proximal. Il est à noter que ce mécanisme est conservé chez la levure et les mammifères (LEWIS *et al.*, 1996; COLOT *et al.*, 1996; COWLING, 2010).

La relation entre la coiffe et l'épissage d'un transcrit ayant plusieurs introns a été exhaustivement étudiée par des essais *in vitro*. En effet, le groupe de Shimura a opté pour un transcrit pourvu de trois exons où trois conditions ont été testées, soit un transcrit coiffé et méthylé, un transcrit uniquement coiffé et un transcrit non coiffé. Ces différents transcrits ont été incubés avec un extrait nucléaire de cellules HeLa afin d'observer si ces transcrits sont ciblés par la machinerie d'épissage. Dans le contexte où les transcrits sont coiffés, peu importe l'état de méthylation de la coiffe, le produit majoritaire est un ARN totalement épissé. En ce qui concerne le transcrit non coiffé, le produit majoritaire correspond à un intermédiaire d'épissage où seulement le deuxième intron est excisé et aucun produit totalement épissé n'est détectable. Ce résultat suggère que la coiffe est importante pour l'épissage du premier intron (OHNO *et al.*, 1987).

4.2 Épissage et polyadénylation

La preuve que l'épissage et la polyadénylation s'influencent mutuellement a été initialement démontrée par des mutations à quelques éléments agissants en cis. Par exemple, des mutations à la séquence 3' ss ou la région riche en pyrimidines diminuent l'efficacité d'épissage tout en affectant l'activité de clivage et de polyadénylation *in vitro* (COOKE et ALWINE, 1996; VAGNER *et al.*, 2000). Parallèlement, la séquence 3'ss de l'intron stimule la polyadénylation tandis que la séquence 5'ss n'a aucun impact sur la polyadénylation (NIWA *et al.*, 1990). Conformément avec les résultats précédents, une étude *in vivo* a établi que le clivage du pré-ARNm du gène de la β -globine humaine requiert la présence du dernier intron et plus précisément, la région riche en pyrimidines (ANTONIOU *et al.*, 1998; MILLEVOI *et al.*, 2002).

De même, des mutations à la séquence AAUAAA inhibent l'excision du dernier intron sans affecter l'épissage des introns situés en amont (NIWA et BERGET, 1991). Parallèlement à cette étude, l'inhibition de la fonction de CPSF par le domaine effecteur de la protéine NS1A se répercute par la présence de transcrits qui ne sont aucunement clivés, polyadénylés et épissés. L'étude plus approfondie démontre que la sous-unité 30K du facteur CPSF est requise pour l'épissage du transcrit (LI *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont démontré une interaction physique entre la machinerie d'épissage et celle du clivage et de la polyadénylation. Par exemple, le facteur auxiliaire U2AF65 interagit avec le facteur de clivage CFI_m et cette interaction stimule le clivage et la polyadénylation *in vitro* (RAPPSILBER *et al.*, 2002; MILLEVOI *et al.*, 2006). Parallèlement, le facteur d'épissage SFm160 interagit directement avec CPSF tout en stimulant le clivage du transcrit (McCRACKEN *et al.*, 2002). De même, l'interaction entre CPSF et U2 snRNP contribue à supporter que l'épissage et la polyadénylation sont des étapes intimement liées (KYBURZ *et al.*, 2006). De plus, la séquence AAUAAA et la partie C-terminal de la PAP ont un effet positif sur l'épissage puisque ces deux éléments favorisent la liaison de U2AF65 à la région riche en pyrimidines (VAGNER *et al.*, 2000).

Plusieurs facteurs s'associent à la séquence USE, dont la protéine liant la séquence riche en pyrimidines (PTB). La protéine PTB stimule l'efficacité de clivage et de polyadénylation lorsqu'elle s'associe à la séquence USE du pré-ARNm de cyclooxygénase-2 (COX-2) et de prothrombine (F2) (DANCKWARDT *et al.*, 2007; HALL-POGAR *et al.*, 2007). De même, l'association de la protéine PTB à USE permet de recruter directement le facteur d'épissage hnRNP H à la séquence G-riche localisée en amont de l'hexamère AAUAAA et ce recrutement stimule *in vitro* la processivité de la PAP (MILLEVOI *et al.*, 2009). Par contre, le clivage du pré-ARNm de la β -globine humaine est inhibé lorsque la protéine PTB s'associe à la séquence DSE (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2004).

Pour réconcilier toutes ces données, un modèle a été proposé où le CTD de l'ARN Pol II est associé simultanément aux facteurs requis pour l'épissage, le clivage et la polyadénylation. Ainsi, le pré-ARNm est clivé et polyadénylé tout en restant associé au CTD afin de favoriser la dernière étape de maturation qui consiste à exciser le dernier intron pour générer l'ARNm (RIGO et MARTINSON, 2008).

L'interrelation entre l'épissage et la polyadénylation est clairement démontrée lorsqu'un signal de polyadénylation se localise dans la séquence intronique. Deux choix sont envisageables: l'utilisation du signal de polyadénylation intronique, ce qui génère un transcrit alternatif ou l'épissage du transcrit sans tenir compte du signal de polyadénylation intronique. Il a été démontré que le signal de polyadénylation intronique est favorisé lorsque l'intron est très long et/ou contient une séquence 5'ss faible. En effet, l'épissage d'un intron ayant ces caractéristiques est moins efficace et procure un intervalle de temps pour la polyadénylation (TIAN *et al.*, 2007). Par contre, l'association de plusieurs facteurs associés à U1 snRNP (U1A et U1 70K) à la séquence 5'ss a un effet négatif sur la polyadénylation intronique (GUNDERSON *et al.*, 1994 et 1998).

4.3 Polyadénylation et terminaison de la transcription

Traditionnellement, la polyadénylation et la terminaison de la transcription étaient considérées comme étant des processus séparés et séquentiels. Par contre, en se référant à la

section 3.3 (Modèle hybride entre allostérique et torpedo) et aux différentes études, ces deux étapes sont intimement liées.

L'association directe entre le clivage et la polyadénylation avec la terminaison de la transcription a été établie par l'étude du gène *CYCI* chez *S. cerevisiae* (BIRSE *et al.*, 1998). Des déplétions conditionnelles et des mutations aux facteurs impliqués dans le clivage d'un pré-ARNm (Rna14, Rna15, Pcf11, Yhh1 et Ysh1) perturbent la terminaison par la transcription inadéquate de l'extrémité 3' du gène (*read-through*). En revanche, des mutations aux facteurs de polyadénylation (Pap1, Fip1 et Yth1) n'ont que très peu d'effet sur la terminaison de la transcription. Ainsi, les facteurs requis pour le clivage sont intimement liés à la terminaison de la transcription (BIRSE *et al.*, 1998; DICHTL *et al.*, 2002b; SADOWSKI *et al.*, 2003; GARAS *et al.*, 2008).

Tel que mentionné à la section 3.3, Rat1 est important pour favoriser le clivage optimal du transcrit. En effet, Rat1 contribue à recruter les facteurs impliqués dans le clivage et la polyadénylation du transcrit, notamment Pcf11 et Rna15 (LUO *et al.*, 2006). La relation inverse est aussi observable, c'est-à-dire que le facteur Pcf11 est requis pour le recrutement de Rat1. Il a été caractérisé que le domaine CID de Pcf11 doit être intact pour stimuler efficacement la terminaison de la transcription et des mutations à ce domaine n'ont aucun impact sur le clivage et la polyadénylation *in vitro* (SADOWSKI *et al.*, 2003). L'interrelation entre la polyadénylation et la terminaison a aussi été démontrée chez les mammifères avec le multi-complexe protéique p54nrb/PSF qui est soupçonné d'être impliqué lors de la transcription, l'épissage et la polyadénylation (GOZANI *et al.*, 1994; LIANG et LUTZ, 2006). Ce multi-complexe p54nrb/PSF recrute l'exoribonucléase XRN2 pour faciliter le clivage et la polyadénylation d'un transcrit tout en ayant un impact positif sur la terminaison de la transcription (KANEKO *et al.*, 2007).

De plus, le signal de polyadénylation fort et fonctionnel est nécessaire pour une terminaison adéquate (RUSSO, 1995; OSHEIM *et al.*, 1999; OROZCO *et al.*, 2002). Il est à noter que la densité de l'ARN Pol II augmente à l'extrémité 3' du gène juste avant la

terminaison de la transcription, ce qui reflète une pause de l'ARN Pol II. Cette pause transcriptionnelle s'effectue en aval de l'hexamère AAUAAA et semble jouer un rôle sur le clivage, la polyadénylation et la terminaison pour au moins deux gènes, tels que α -globine et γ -globine (ENRIQUEZ-HARRIS *et al.* 1991; PLANT *et al.* 2005). Il a été suggéré que l'hexamère AAUAAA et le facteur CPSF peuvent induire la pause de l'ARN Pol II sans l'implication du CTD ou de tout autres éléments séquentiels situés en aval de l'hexamère AAUAAA (OROZCO *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2004; NAG *et al.*, 2006, 2007).

L'interrelation entre la polyadénylation et la terminaison de la transcription dépend, entre autres, du CTD de l'ARN Pol II puisque cette structure fait la connexion entre ces facteurs. Ainsi, le CTD est requis pour la terminaison de la transcription (McCRACKEN *et al.*, 1997; BURATOWSKI, 2005) étant donné que plusieurs facteurs nécessaires à la terminaison de la transcription, dont Rna14, Yhh1, Pcf1 1 et Nrd1 lient directement le CTD (PROUDFOOT, 2004).

5. EXPORT DES ARNm

L'export des ARNm diffère des autres ARNs (ARNt, microARN, snRNA et ARNr), car il n'implique pas les exportines de la famille des karyophérines et du cycle de Ran, mais plutôt le complexe TREX (transcription/export) (STEWART, 2010). L'export des ARNm a été exhaustivement caractérisé chez la levure *S. cerevisiae* et les mammifères. Ce processus est conservé au cours de l'évolution, mais les protéines diffèrent entre les espèces (REED et HURT 2002; KELLY et CORBETT, 2009). Par exemple, chez *S. pombe*, ces protéines correspondent à un assortiment se retrouvant tant chez la levure *S. cerevisiae* que chez les mammifères.

Chez *S. cerevisiae*, le complexe TREX inclus les protéines impliquées dans l'export (Sub2, Yra1 et Tex1) et la sous-unité THO (Tho2, Hrp1, Mft1 et Thp2). Cette sous-unité est recrutée spécifiquement aux gènes activement transcrits par son association à l'ARN Pol II (ABRUZZI *et al.*, 2004), ce qui suggère un rôle éventuel du complexe TREX durant

l'élongation de la transcription (STRÄSSER *et al.*, 2002; ZENKLUSEN *et al.*, 2002). En effet, des délétions de facteurs associés à la sous-unité THO engendrent la formation d'hybrides entre l'ARN nouvellement transcrit et l'ADN, ce qui entraîne l'inhibition de l'élongation de la transcription (HUERTAS et AGUILERA, 2003).

5.1 Mécanisme moléculaire de l'export

La sous-unité THO est recrutée co-transcriptionnellement aux gènes transcrits et Hrp1 recrute les facteurs Yra1 et Sub2 sur le pré-ARNm nouvellement transcrit (ZENKLUSEN *et al.*, 2002; STEWART, 2010). Une fois que la coiffe des ARNm est recouverte des protéines CBP20/80 et que les protéines adaptatrices (Nab2, Npl3, Hrb1) se retrouvent associées à l'ARNm, Yra1 recrute les récepteurs d'export Mex67-Mtr2 tout en engendrant la dissociation de Sub2 et de la sous-unité THO de l'ARNm (STRÄSSER et HURT, 2000; STEWART, 2010). Lorsque l'ARNm pénètre dans le pore nucléaire (NPC), il interagit physiquement avec les répétitions riches de Phe-Gly des FG nucléoporines (TERRY et WENTE, 2007), ce qui permet d'exporter l'ARNm. Lors du transit dans le pore nucléaire, le mRNP est remodelé avec l'aide des protéines Dbp5, Gle1 et InsP6 pour permettre le détachement de Mex67-Mtr2 de l'ARNm engendrant la libération de l'ARNm au cytosol (ALCÁZAR-ROMÁN *et al.*, 2006) (Figure 6).

5.2 Contrôle de qualité au niveau du pore nucléaire

Le contrôle de qualité associé au pore nucléaire consiste à exporter uniquement les ARNm matures au cytosol et nécessite, entre autres, l'action de la protéine Mlp1 qui se localise à l'intérieur de l'entrée du pore nucléaire. Par conséquent, la délétion de Mlp1 entraîne le relâchement des pré-ARNm non-épissés au cytosol (GALY *et al.*, 2004). De plus, Mlp1 retient au noyau les pré-ARNm associés à la protéine BBP/scSF1 puisque ces transcrits sont en processus d'épissage (RUTZ et SÉRAPHIN, 2000; CASOLARI et SILVER, 2004). La fonction de rétention de Mlp1 serait médiée par la séquence 5'ss puisqu'une mutation à cette séquence produit le même effet qu'un transcrit n'ayant aucune mutation au 5'ss dans une souche $\Delta mlp1$ (GALY *et al.*, 2004). Par contre, ce contrôle de qualité ne semble pas être à toute épreuve puisqu'il est possible de détecter des pré-ARNm

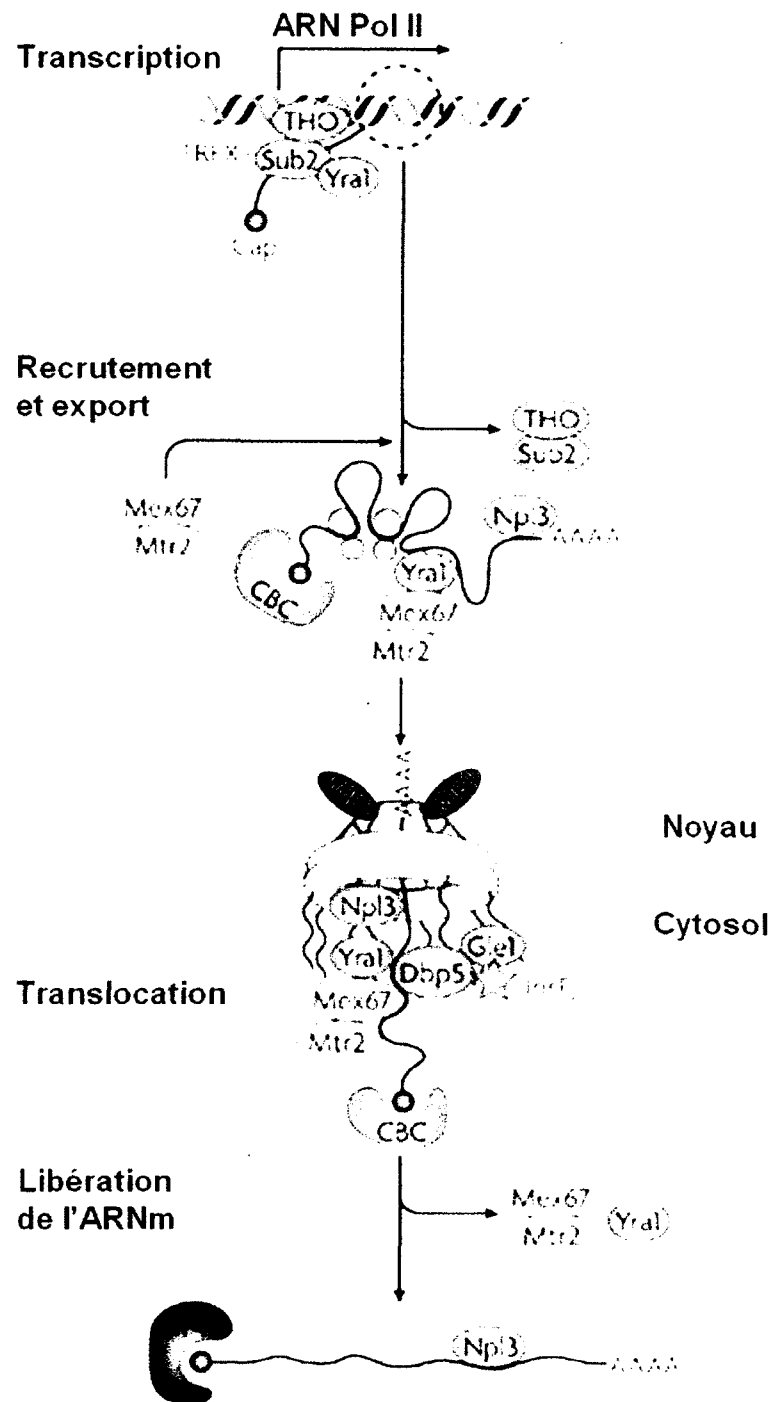


Figure 6. Mécanisme d'export d'ARNm couplé à la transcription.

Le complexe TREX est recruté lors de la transcription du transcrit. La description de cette figure se retrouve dans le texte. CBC: *Cap Binding Complex* (CBP20/80). Figure adaptée de KÖHLER et HURT, (2007).

non-épissés au cytosol, notamment des pré-ARNm ayant des séquences d'épissage non-consensuelles (LEGRAIN et ROSBASH, 1989; HILLEREN et PARKER, 2003).

Plusieurs facteurs contribuent à l'export nucléaire des ARNm, dont Mex67, Mtr2, Gle1 et Dbp5 (STEWART, 2010) et des mutations de ceux-ci entraînent une séquestration rapide des ARNm hyperadénylés au site de transcription ou à proximité (JENSEN *et al.*, 2001). De plus, la délétion individuelle des sous-unités du complexe THO (Hrp1, Mft1, Thp2 et Tho2) entraîne la rétention des ARNm au site de transcription, tandis que la délétion de Rrp6 entraîne le relâchement de ces transcrits au cytosol (ROUGEMAILLE *et al.*, 2007). Des ARNm non polyadénylés sont aussi retenus au site de transcription par l'action de l'exosome et de l'exoribonucléase Rrp6 (HILLEREN *et al.*, 2001). Ainsi, des mutants spécifiques à l'exosome entraînent le relâchement des ARNm hypo- ou hyperadénylés au cytosol et ces ARNs peuvent être traduits. Les fonctions détaillées de Rrp6 et de l'exosome sont décrites à la section 7.1.

6. TRADUCTION

La traduction est un processus où les ribosomes lient le message génétique de l'ARNm pour générer une protéine spécifique selon les instructions du message (NAKAMOTO, 2009). Ce mécanisme est hautement conservé chez tous les organismes, mais l'initiation de la traduction diffère entre les procaryotes et les eucaryotes (KOZAK, 2005). Il est à noter que la traduction est l'étape cellulaire qui requiert la plus grande source d'énergie.

Le ribosome est constitué de deux sous-unités, soit la grande et la petite qui sont, toutes les deux, composées d'ARN et de protéines ribosomales. Chez les eucaryotes, la grande sous-unité (60S) est composée du 5.8S ARNr, 5S ARNr, 28S ARNr et d'environ 50 protéines tandis que la petite sous-unité (40S) est constituée du 18S ARNr et d'environ 30 protéines. La grande sous-unité contient le centre du peptidyl transférase, soit le domaine où l'ARNt s'associe et la petite sous-unité lit les codons de l'ARNm (KRESSLER *et al.*, 2010).

Initialement, sans détailler tous les facteurs, la coiffe de l'ARNm est reconnue par eIF4E qui s'associe à eIF4G pour ensuite se lier à PABPC1 afin de circulariser l'ARNm. Par la suite, le complexe d'initiation à la traduction continue à s'assembler spécifiquement avec tous les facteurs requis. Une fois que le complexe d'initiation est formé, l'ARNt^{met} et la petite sous-unité sont recrutés à l'ARNm (STEITZ, 2008). Rapidement, la grande sous-unité se joint afin d'assembler le ribosome où l'ARNm est immobilisé entre les deux sous-unités. La synthèse protéique débute par la translocation du ribosome au codon subséquent permettant à un ARNt chargé pour un acide aminé spécifique de s'insérer au centre du peptidyl transférase. Lorsque le ribosome rencontre un codon stop, la traduction se termine provoquant le relâchement du polypeptide et la dissociation entre les deux sous-unités (STEITZ, 2008; SONENBERG et HINNEBUSCH, 2009). Il est à mentionner que la traduction active de l'ARNm s'effectue après le premier tour de traduction.

Malgré le fait que le ribosome ne synthétise qu'un seul polypeptide à la fois, l'ARNm peut être traduit simultanément par plusieurs ribosomes (polysome) (ARAVA *et al.*, 2003). Tel que mentionné, la circularisation de l'ARNm facilite la réinitiation du ribosome sur le même ARNm (VON DER HAAR *et al.*, 2004). Il est possible d'étudier l'association d'une protéine d'intérêt aux sous-unités du ribosome, au ribosome et au polysome lorsque les cellules sont traitées avec des drogues spécifiques (MAŠEK *et al.*, 2011). De plus, il est possible de discerner si l'absence d'une protéine influence positivement ou négativement la traduction.

6.1 Modification post-traductionnelle

Une modification post-traductionnelle est une modification chimique d'une protéine, réalisée le plus souvent par une enzyme, après la synthèse protéique ou au cours de la vie cellulaire de la protéine. Généralement, cette modification entraîne un changement fonctionnel de la protéine, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie ou de sa localisation cellulaire. Les modifications post-traductionnelles les plus courantes sont la phosphorylation, la glycosylation, la méthylation, la N-acétylation, la lipidation et la protéolyse limitée.

6.1.1 Méthylation des arginines

La méthylation des arginines consiste à ajouter un groupement méthyle sur des résidus d'arginine par un groupe d'enzymes appelé protéine arginine méthyltransférase (prmt) et ces enzymes utilisent la S-adénosyl-méthionine comme donneur de méthyle. Les gènes codant pour les prmt ont été identifiés chez le génome de la levure, du nématode, de la mouche, de la plante et des mammifères, toutefois ces enzymes sont absentes chez les procaryotes (BEDFORD et CLARKE, 2009). Chez *S. pombe*, il existe trois prmts (prmt1, prmt3, prmt5) tandis qu'il y en a dix chez l'humain (BACHAND, 2007; BEDFORD, 2007).

La méthylation d'arginine est caractérisée par l'ajout d'un groupe monométhyl ou diméthyl sur l'azote guanidino (ω) de l'arginine (BEDFORD, 2007). La méthylation d'arginine se produit le plus souvent à une séquence d'acide aminé RGG et plus rarement aux motifs, tels que RXR et GRG (BEDFORD et RICHARD, 2005). Toutes les prmts peuvent catalyser la monométhylation des arginines et ces enzymes sont divisées en deux classes majeures qui dépendent du type de diméthylarginine généré. Les prmts de type 1 modifient la protéine par la catalyse asymétrique N^G-N^G -diméthylarginine tandis que les prmts de type 2 catalysent la formation symétrique $N^G-N'^G$ -diméthylarginine (McBRIDE et SILVER, 2001). La PRMT1 est responsable de la majorité des diméthylations asymétriques chez l'humain et la levure à bourgeon (GARY *et al.*, 1996; BEDFORD et CLARKE, 2009).

Selon plusieurs études, la méthylation d'arginine semble avoir un impact sur une variété de processus cellulaires, notamment la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN et la biosynthèse des ribosomes. Par exemple, chez *S. pombe*, la sous-unité ribosomale 60S s'accumule dans les cellules $\Delta rmt3$, ce qui se répercute par un changement de ratio entre les sous-unités 40S et 60S (BACHAND et SILVER, 2004).

Le rôle de la méthylation d'arginine dans les voies cellulaires semble être régulé par des activités biochimiques, telles que la transcription, le remodelage de la chromatine et les interactions protéine-protéine. Entre autres, les protéines SmD1 et SmD3 doivent être symétriquement méthylées aux arginines afin de lier efficacement la protéine SMN

(FRIESEN *et al.*, 2001). Aussi, la méthylation médiée par CARM1/PRMT4 a un effet positif sur la transcription lorsque l'histone H3 et différents cofacteurs dont p300/CBP et AIB1 sont méthylés (BEDFORD et RICHARD, 2005). CARM1/PRMT4 méthyle, entre autres, des facteurs d'épissage et régule l'interrelation entre la transcription et l'épissage (CHENG *et al.*, 2007). De plus, la méthylation est importante pour la localisation cellulaire de certaines protéines. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, la méthylation des protéines Npl3 et Hrp1 par Rmt1 est un pré-requis pour observer ces protéines au cytosol. (SHEN *et al.*, 1998).

7. MACHINERIE DE DÉGRADATION

Les différents mécanismes de dégradation permettent de maturer certains ARNs et de dégrader les transcrits incorrectement maturés et ceux comportant des erreurs. Une des machineries de dégradation impliquées pour ces fonctions est l'exosome nucléaire.

7.1 Exosome

Initialement, l'exosome a été découvert chez *S. cerevisiae* pour son activité à maturer l'ARN ribosomal 5.8S (MITCHELL *et al.*, 1997). Depuis, l'exosome a été identifié chez différents organismes, tels que l'humain, les plantes, la mouche et les *archaea*. Outre son rôle à maturer l'ARN ribosomal 5.8S, l'exosome a été caractérisé pour dégrader et maturer différents types d'ARN, dont l'ARNm, l'ARNr, le snoRNA et le snRNA (LORENTZEN *et al.*, 2005).

7.1.1 Structure moléculaire

La composition de l'exosome dépend de l'organisme et de la localisation cellulaire. Ainsi, l'exosome *archaea* qui est l'ancêtre de l'exosome eucaryote, est composé de trois hétérodimères (Rrp41-Rrp42) qui s'assemblent pour former un anneau où les protéines Rrp41 et Rrp42 sont disposées en alternance. Ces deux protéines ont le domaine RNase PH, toutefois seul Rrp41 est catalytiquement actif (LORENTZEN *et al.*, 2005). Ainsi, l'ARN doit être non structuré afin qu'il puisse entrer dans l'exosome (HOUSELEY *et al.*, 2006).

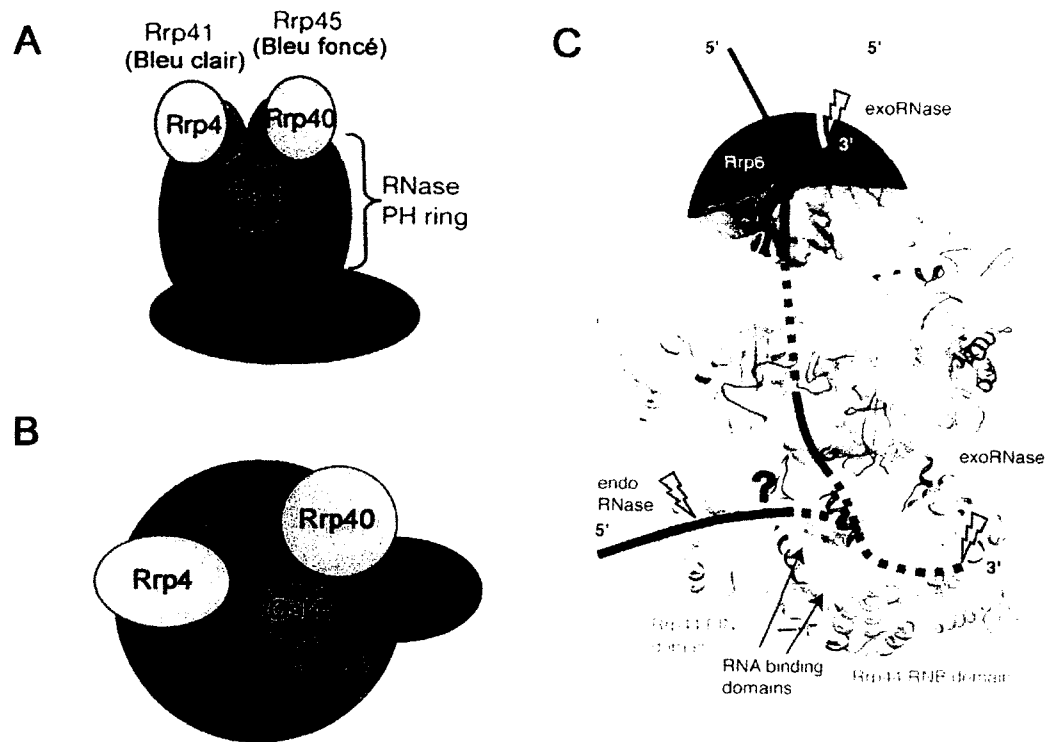


Figure 7. Structure de l'exosome et les voies possibles de dégradation de l'ARN par l'exosome.

Représentation des neuf sous-unités de l'exosome avec le facteur Rrp44 de *S. cerevisiae* (A) vue de côté. (B) vue de haut. (C) L'ARN (ligne jaune) peut être ciblé par Rrp6 ou il (ligne rouge) peut entrer dans le cœur de l'exosome afin d'être dégradé par l'activité exoribonucléase de Rrp44. L'ARN (ligne verte) peut être ciblé par l'activité endoribonucléase de Rrp44 et il peut aussi emprunter cette voie pour atteindre l'activité exoribonucléase de Rrp44. Les sites actifs de l'exosome sont indiqués par des éclairs. Figure adaptée de MALET *et al.*, (2010) et MALET et LORENTZEN, (2011).

Chez tous les eucaryotes, le cœur de l'exosome est hautement conservé tout en étant composé de neuf sous-unités disposées en forme de baril (Figure 7A et B). Par ailleurs, chez la levure, chaque sous-unité du cœur de l'exosome est essentielle pour la viabilité des cellules (ALLMANG *et al.*, 1999b). Parmi les neuf sous-unités, six protéines contiennent le domaine RNase PH, mais celles-ci ont perdu leur activité phosphorolytique. Par conséquent, le cœur de l'exosome n'a aucune activité RNase PH et l'activité catalytique de l'exosome dépend de la protéine Rpp44/Dis3 qui est associée au cœur de l'exosome (LIU *et al.*, 2006; DZIEMBOWSKI *et al.*, 2007).

Le facteur Rpp44/Dis3 possède les activités endo- et 3'→5' exoribonucléase de la famille II. Cette enzyme fait partie de cette famille puisqu'elle contient le domaine caractéristique de la RNase II (RNB) qui procure une activité 3'→5' exoribonucléase hautement processive. Chez la levure et les humains, Rrp44 se situe vers le bas du baril et ce facteur est moins bien associé au cœur de l'exosome que les neuf sous-unités (LIU *et al.*, 2006). Chez les humains, deux homologues distincts de Dis3 ont été identifiés, soit hDIS3 et hDIS3L. hDIS3 est principalement nucléaire tandis que hDIS3L se localise uniquement au cytosol. Les deux homologues de Dis3 sont des exoribonucléases actives, toutefois seul hDIS3 possède l'activité endonucléolytique (STAALS *et al.*, 2010, TOMECKI *et al.*, 2010). De plus, l'exosome est associé à une deuxième 3'→5' exoribonucléase active, soit Rrp6 de la famille des RNaseD. Rrp6 se localise majoritairement au noyau et se retrouve aussi au cytosol des cellules humaines (CHEN *et al.*, 2001) tandis que cette enzyme non-essentielle se localise au noyau chez la levure (ALLMANG *et al.*, 1999b).

7.1.2 Reconnaissance et dégradation de l'ARN

La capacité de l'exosome à distinguer les différentes classes d'ARN semble être effectuée, en partie, par la présence de cofacteurs et/ou de modifications covalentes à l'ARN. Ainsi, Rrp44 et Rrp6 contiennent différents motifs conservés qui sont requis pour interagir avec ces facteurs de régulation. Certaines étapes de dégradation et de maturation dépendent entièrement de l'une des deux exoribonucléases. Cet aspect est cohérent avec les études biochimiques et structurales qui montrent des mécanismes d'action très différents

entre Rrp44 et Rrp6 (LIU *et al.*, 2006; LORENTZEN *et al.*, 2008). En effet, Rrp44 est une enzyme processive qui s'associe étroitement à son substrat d'ARN afin de le dégrader complètement. Par contre, l'activité de Rrp6 est distributive, ce qui se répercute par une dégradation partielle de l'ARN. Par conséquent, la dégradation effectuée par Rrp6 s'appuie sur une série de liaisons au substrat avant qu'il soit entièrement dégradé. De plus, Rrp44 dégrade les substrats structurés et non structurés tandis que Rrp6 dégrade préférentiellement les substrats non structurés. Il a été prouvé que Rrp6 est capable de dégrader des ARNr polyadénylés indépendamment du cœur de l'exosome, ce qui est compatible avec les différentes fonctions de Rrp6 et de l'exosome (CALLAHAN et BUTLER, 2008).

Des études structurales sur l'exosome eucaryote ont montré que Rrp44 est accessible à l'ARN par deux façons, soit par une interaction directe entre les deux composantes ou lorsque l'ARN pénètre dans le cœur de l'exosome afin d'atteindre Rrp44 étant situé à l'extrémité du baril (Figure 7C). La première indication illustrant l'utilisation du cœur de l'exosome a été montrée chez la levure (BONNEAU *et al.*, 2009). Ainsi, cette structure de l'exosome protège environ 30 nt de l'ARN non structuré, ce qui correspond à la distance entre l'entrée du cœur de l'exosome et le facteur Rrp44. Par conséquent, les ARNs ayant des structures secondaires ou tertiaires ne peuvent pas pénétrer dans le cœur de l'exosome, ce qui prévient, entre autres, la dégradation des ARNs matures. Par conséquent, seuls les ARNs ayant une extrémité 3' non structurée peuvent être dégradés par le cœur de l'exosome.

Le domaine PIN localisé en N-terminal de la protéine Rrp44 est impliqué lors des clivages endonucléolytiques (SCHNEIDER *et al.*, 2009) et le substrat d'ARN n'est pas contraint à interagir avec le cœur de l'exosome (Figure 7C). Le site actif du domaine PIN est catalytiquement actif et accessible lorsque des résidus acides conservés sont en présence d'ions métalliques divalents (BONNEAU *et al.*, 2009). L'inactivation de ce domaine par mutation ponctuelle a des effets limités sur la maturation des ARNs et sur la croissance cellulaire. Cette observation suggère que les ARNs sont encore dégradés, malgré l'absence du clivage endonucléolytique. Ainsi, le domaine PIN ne semble pas coopérer avec l'activité exoribonucléolytique de Rrp44. De plus, le domaine PIN faciliterait la

dégradation d'ARN structuré ayant un 5'monophosphate (LEBRETON *et al.*, 2008; SCHAEFFER *et al.*, 2009). L'action de l'exosome est stimulée par le complexe TRAMP et ce mécanisme est décrit à la section 7.2.

7.1.3 Fonction spécifique de l'exosome

Jusqu'à présent, l'exosome cytosolique a été caractérisé pour dégrader les ARNm ciblés par le *nonsense-mediated decay* (NMD) et le *non-stop decay* (NSD) (HOUSELEY et TOLLERVEY, 2009). Ainsi, chez la levure, la protéine adaptatrice Ski7 du complexe Ski recrute directement l'exosome à un transcrit en cours de traduction lorsque l'ARNm possède un codon stop prématuré ou s'il ne possède pas de codon stop (ARAKI *et al.*, 2001).

Tel que mentionné précédemment, l'exosome est impliqué dans la maturation de certains transcrits, notamment les ARNr, snoRNAs et snRNAs. Ainsi, la maturation en 3' de l'ARNr 5.8S requiert toutes les composantes de l'exosome, l'exoribonucléase Rrp6 et l'hélicase Mtr4 (DE LA CRUZ, *et al.*, 1998). De plus, les pré-snoRNAs sont maturés par un processus séquentiel impliquant l'exosome et Rrp6. Aussi, l'exosome participe à maturer les snRNA U1, U4 et U5 (ALLMANG *et al.*, 1999a; MITCHELL *et al.*, 2003).

7.2 TRAMP

La caractérisation initiale du complexe TRAMP avec l'exosome nucléaire a été rapportée pour la surveillance nucléaire et la dégradation du pré-ARNt^{met} (KADABA *et al.*, 2004). Des travaux subséquents ont démontré que le TRAMP est impliqué pour dégrader différents types d'ARNs, notamment les pré-ARNm aberrants, les ARN non-codants et les précurseurs des ARNr, ARNt, snRNAs et snoRNAs (HOUSELEY *et al.*, 2006).

Il a été répertorié que l'activité de dégradation de l'exosome purifié est relativement faible puisque différents intermédiaires de dégradation sont discernables (MITCHELL *et al.*, 1997). Cette donnée indique que la dégradation rapide requiert la présence de cofacteurs. Ainsi, la combinaison de l'exosome avec le complexe TRAMP diminue

l'accumulation de ces intermédiaires suggérant que l'exosome est stimulé par le TRAMP (LACAVA *et al.*, 2005). L'action stimulatrice du TRAMP sur l'exosome a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, l'activité hydrolytique de Rrp6 est améliorée par le complexe TRAMP, ce qui stimule la dégradation des ARNs *in vitro* (CALLAHAN et BUTLER, 2010). Conformément à ce résultat, le TRAMP ne stimule plus Rrp6 lorsque le site actif de Rrp6 est muté (CALLAHAN et BUTLER, 2010).

Le complexe TRAMP a été exhaustivement étudié chez *S. cerevisiae* et celui-ci est constitué d'une protéine liant l'ARN (Air1/Air2), d'une hélicase Mtr4 et d'un des deux paralogues de la poly(A) polymérase non canonique, Trf4 et Trf5 (LACAVA *et al.*, 2005). Contrairement à la poly(A) polymérase (Pap1), une courte queue poly(A) est ajoutée au substrat par la Trf. Le complexe TRAMP de *S. pombe* ressemble à celui de *S. cerevisiae* tout en étant composé d'une poly(A) polymérase non canonique Cid14, d'une hélicase Mtr4 et d'une protéine liant l'ARN, Air1 (KELLER *et al.*, 2010). Il est à noter que seule l'hélicase Mtr4 est une protéine essentielle (DE LA CRUZ, *et al.*, 1998).

Le mécanisme d'action du TRAMP débute lorsque la protéine Air2 lie un ARN ciblé tout en recrutant le complexe TRAMP. L'ARN polymérase Trf4 ajoute une courte queue poly(A) au substrat d'ARN permettant à l'exosome d'initier la dégradation de ce transcrit avec l'aide de l'hélicase Mtr4 (Figure 8). Cette hélicase facilite la dégradation des ARNs structurés et ceux étant fortement associés aux protéines (LACAVA *et al.*, 2005). Dernièrement, il a été démontré que Mtr4 détecterait le nombre d'adénosines présentes à la fin d'un substrat et contrôlerait l'activité de la poly(A) polymérase Trf4. Par conséquent, Mtr4 stimule l'activité de Trf4 pour une polyadénylation rapide lorsque l'hélicase détecte moins de quatre adénosines. Par contre, l'action de Trf4 est inhibée quand Mtr4 détecte plus de quatre adénosines. Le complexe TRAMP restreint l'adénylation après trois à quatre adénosines (JIA *et al.*, 2011).

Il est à noter que la polyadénylation n'est pas essentielle pour activer la dégradation du substrat. En effet, l'analyse génomique de la souche $\Delta trf4$ a démontré que le niveau

d'expression est altéré pour 90% des transcrits. Par contre, la même analyse réalisée avec un mutant où l'activité enzymatique est déficiente (Trf4-DADA) a établi que le profil d'expression ressemble à celui observé pour une souche WT (SAN PAOLO *et al.*, 2009). Conformément à ces résultats, les cellules $\Delta trf5$ pourvu du Trf4-DADA sont viables (Wyers *et al.*, 2005), tandis que la double délétion ($\Delta trf4/\Delta trf5$) est létale (CASTAÑO *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent que la fonction *in vivo* de Trf4/Trf5 n'est pas restreinte à l'activité de polyadénylation.

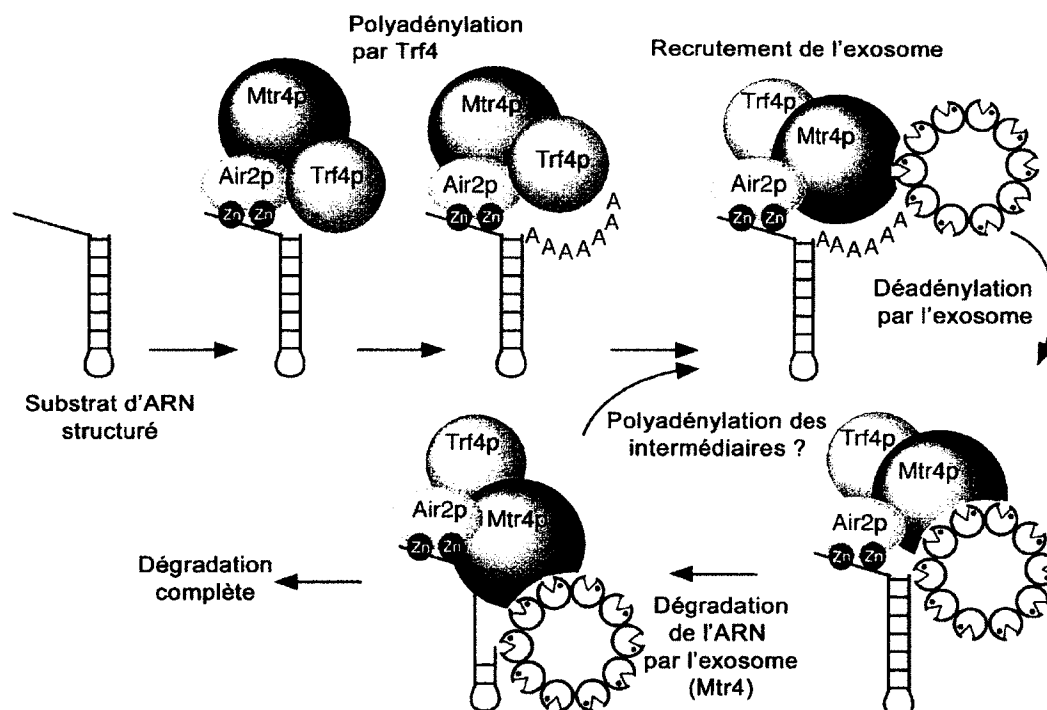


Figure 8. Mécanisme du complexe TRAMP pour la dégradation d'ARN.

La protéine Air2 recrute le complexe TRAMP à l'ARN ciblé. Trf4 avec l'action de Mtr4 ajoute une courte queue poly(A) au substrat d'ARN et l'exosome le dégrade avec l'aide de l'hélicase. Il est probable que les intermédiaires de dégradation sont polyadénylés afin de faciliter la dégradation complète du substrat. Figure adaptée de LACAVA *et al.*, (2005).

7.3 Déadénylase

Pour la majorité des ARNm, la déadénylation précède le retrait de la coiffe et les étapes subséquentes de dégradation chez la levure et les mammifères (PARKER et SONG, 2004). La déadénylation s'effectue au cytosol lors de la dégradation générale des ARNm et permet de réguler la traduction de certains transcrits, notamment les ARNs requis à des étapes précises du cycle cellulaire (BEILHARZ et PREISS, 2007; LACKNER *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, trois différents complexes d'enzymes ont été identifiés comme étant des déadénylases spécifiques aux ARNm.

Chez la levure, le complexe de déadénylase principal contient deux nucléases, Ccr4 et Pop2. L'activité catalytique prédominante au sein de ce complexe est réalisée par Ccr4 tandis que Pop2 améliore la fonction de cette dernière (TUCKER *et al.*, 2002). L'action de Pop2 se répercute par la stabilisation du complexe ou par des interactions supplémentaires entre le complexe de déadénylation et l'ARNm (BAI *et al.*, 1999). L'activité du complexe Ccr4/Pop2 est inhibée lorsque la queue poly(A) est recouverte par Pab1 tandis que la coiffe n'a aucun effet sur ces enzymes (PARKER et SONG, 2004).

Le second complexe de déadénylation est le complexe PAN qui est composé de la déadénylase Pan2 et du facteur auxiliaire Pan3. Le rôle de Pan3 est d'améliorer et de réguler l'activité de Pan2. Tel que mentionné à la section 2.3.1.2, le complexe PAN est impliqué à réguler la taille des queues poly(A) chez *S. cerevisiae* (MANGUS *et al.*, 2004b).

PARN (*poly(A) ribonuclease*) a été initialement purifié de cellules de mammifères et l'homologue de cette enzyme a été identifié chez plusieurs eucaryotes, toutefois cette déadénylase est absente chez *S. cerevisiae* et *D. melanogaster*. L'activité de déadénylation nécessite l'homodimérisation de PARN (WU *et al.*, 2005). Il est à noter que cette enzyme est stimulée par la coiffe tandis que la PABP l'inhibe (DEHLIN *et al.*, 2000). De plus, PARN est requis pour la déadénylation rapide des ARNm comportant des éléments d'instabilité AU-riche de même que des ARNm ciblés par le NMD (LEJEUNE *et al.*, 2003).

Chez la levure, aucune des déadénylases n'est essentielle pour la viabilité des cellules, mais le phénotype observé varie selon le mutant étudié (GOLDSTROHM et WICKENS, 2008). Chez les mammifères, la déadénylation cytoplasmique des ARNm s'effectue de façon biphasique. Ainsi, la queue poly(A) est raccourcie de quelques nucléotides par le complexe PAN (activité distributive) avant que le complexe CCR4-CAF1 dégrade le reste de la queue poly(A) par son activité processive. Ce type de dégradation élimine les transcrits ciblés par le NMD et ceux visés par la dégradation générale des ARNm (YAMASHITA *et al.*, 2005).

8. *POLY(A)-BINDING PROTEIN*

Deux *poly(A)-binding protein* sont conservées durant l'évolution, mais celles-ci sont inexistantes chez les procaryotes. Les deux types de *poly(A)-binding protein* sont bien caractérisés: PABPC1 est localisée au cytosol tandis que PABPN1/PABP2 est au noyau. Comme son nom l'indique, ces protéines lient préférentiellement la queue poly(A) des ARNm.

8.1 *Poly(A)-binding protein* cytosolique (PABPC1)

La protéine PABPC1, hautement conservée, se retrouve chez tous les eucaryotes, soit de la levure à l'homme. Chez certains organismes, le nombre de gènes codant pour la PABPC peut varier. Ainsi, quatre gènes codent pour la PABPC chez l'humain tandis qu'un seul gène est présent chez la levure *S. pombe* et *S. cerevisiae* (MANGUS *et al.*, 2003). PABPC1 est une protéine abondante qui correspond à la forme principale de PABPC exprimée dans les cellules humaines. Les trois autres PABPC sont plutôt spécifiques, notamment la PABPC3 qui est encodée par un gène sans intron s'exprimant uniquement dans les cellules des testicules (FÉRAL *et al.*, 2001) tandis que la PABPC4 (iPABP) s'exprime lorsque les cellules T sont activées (YANG *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que l'ARNm de PABPC4 est plus abondant que celui de PABPC1 dans les cellules du cœur et des muscles squelettiques. Le gène encodant la PABPC5, qui est la dernière PABPC connue, est situé sur le chromosome X (BLANCO *et al.*, 2001). Par contre, seule la PABPC1 sera décrite dans cette section.

8.1.1 Structure et propriétés physiques

Le transcrit de PABPC1 est composé de 15 exons et génère une protéine de 70 kDa. PABPC1 est constituée de quatre motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) localisés en N-terminal de la protéine. Il est important de noter que les motifs RRM1 et RRM2 sont similaires aux motifs RRM3 et RRM4, respectivement (DEO *et al.*, 1999). Les motifs RRM1 et RRM3 sont principalement responsables pour l'association spécifique de PABPC1 à une séquence poly(A) (GE *et al.*, 2008). Le domaine C-terminal est hautement conservé par la présence de 5 hélices α , mais la première hélice est absente chez l'orthologue de la levure *S. cerevisiae* (Pab1) (KOZLOV *et al.*, 2001 et 2002). Ce domaine est impliqué dans la dimérisation de PABPC1 (KÜHN et PIELER, 1996) tout en participant aux interactions protéiques qui facilite la traduction, notamment les protéines Paip1 et eRF3 (KOZLOV *et al.*, 2001). À titre d'information, la PABPC1, la PABPC3 et la PABPC4 ont la même organisation structurale, toutefois la PABPC5 est seulement constituée des quatre RRMs (BLANCO *et al.*, 2001).

PABPC1 lie spécifiquement la séquence poly(A) avec une faible affinité pour les séquences poly(U) et poly(G) et aucune liaison n'est détectable pour une séquence poly(C). Un minimum de 12 nt est requis pour une liaison optimale de PABPC1 à une séquence poly(A) (SACHS *et al.*, 1987; KÜHN et WAHLE, 2004) et l'unité de répétition entre chaque PABPC1 liant la même séquence poly(A) est approximativement de 25 nt (SACHS *et al.*, 1987; PENG *et al.*, 2008). De plus, deux arginines situées entre les quatre RRMs et le domaine C-terminal sont méthylées par CARM1/PRMT4, mais le rôle de cette modification post-traductionnelle reste inconnue (LEE et BEDFORD, 2002). Il est à noter que Pab1 est une protéine essentielle chez la levure *S. cerevisiae* (SACHS *et al.*, 1987; KOZLOV *et al.*, 2002).

8.1.2 Localisation

PABPC1 et Pab1 se localisent au cytosol à l'état stationnaire, toutefois ces deux protéines font la navette entre le cytosol et le noyau (AFONINA *et al.*, 1998; BRUNE *et al.*, 2005). Il est à noter que les deux premiers RRMs de PABPC1 sont nécessaires et

suffisants pour observer cette protéine au noyau (AFONINA *et al.*, 1998). De plus, PABPC1 s'accumule préférentiellement au noyau lors d'une infection virale (Sarcome de Kaposi, Rotavirus et virus herpès simplex) et lors de stress cellulaires, tels que le choc thermique et le stress oxydatif (MA *et al.*, 2009; LEE et GLAUNSINGER, 2009; SALAUN *et al.*, 2010). Durant ces situations, la quantité d'ARNm présent au cytosol diminue engendrant un surplus de PABPC1 libre au cytosol. Dans ce contexte, PABPC1 s'associe à l'*importin α* afin d'être relocalisée au noyau (KUMAR *et al.*, 2011).

Chez *S. cerevisiae*, l'importation de Pab1 au noyau est médiée par les récepteurs Kap108/Sxm1 tandis que son exportation se réalise par deux voies: la voie principale est dépendante de Xpo1/Crm1 et la voie alternative nécessite Mex67 et/ou l'export d'ARNm (BRUNE *et al.*, 2005).

8.1.3 Fonction

La fonction la plus connue de PABPC1 et de Pab1 est de circulariser l'ARNm tout en stimulant la ré-initiation de la traduction (Figure 9). Cette circularisation favorise le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome et protège l'ARNm contre les exoribonucléases (AMRANI *et al.*, 2008; LIVINGSTONE *et al.*, 2010). L'ARNm est circularisé lorsque le facteur de traduction eIF4G interagit conjointement avec le deuxième RRM de PABPC1 (KESSLER et SACHS, 1998) et avec eIF4E qui est associé à la coiffe (MARTINEAU *et al.*, 2008). De plus, le complexe tertiaire composé de PABPC1, Paip1 et eIF3 favorise efficacement la traduction tout en stabilisant la conformation circulaire de l'ARNm avec le facteur eIF4G (MARTINEAU *et al.*, 2008).

L'association de PABPC1 avec le facteur eRF3 promouvoit efficacement la terminaison de la traduction tout en s'opposant au NMD, un mécanisme de surveillance qui vise à éliminer les ARNm ayant des codons stop prématurés. En effet, une étude *in vitro* a démontré que PABPC1 inhibe l'interaction entre le facteur eRF3 et l'une des composantes du NMD, Upf1 (Figure 9). De plus, PABPC1 empêche l'action du NMD lorsque le codon stop prématuré est localisé à proximité du vrai codon de terminaison (SINGH *et al.*, 2008).

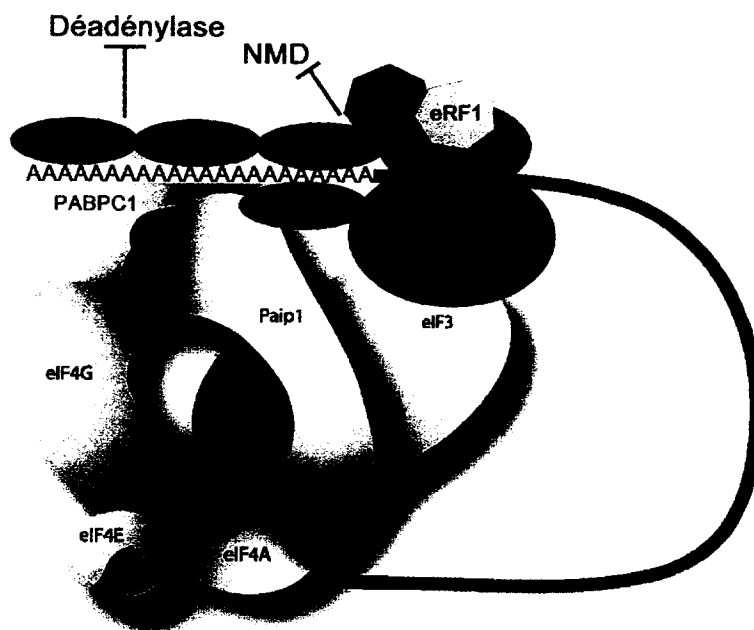


Figure 9. Rôle de PABPC1 dans la stabilisation et la traduction de l'ARNm.

Paip1 et eIF3 stabilisent l'interaction entre eIF4G et PABPC1 pour stimuler la traduction. L'interaction entre eRF1 et PABPC1 inhibe le mécanisme du NMD. Les déadénylases sont inhibées lorsque PABPC1 s'associe à la queue poly(A). M7G: coiffe de l'ARNm. Figure adaptée de MANGUS *et al.*, (2003) et MARTINEAU *et al.*, (2008).

PABPC1 stabilise le transcrit tout en facilitant la modulation du taux de déadénylation des ARNm. Ainsi, l'ARNm est protégé contre les déadénylases lorsque PABPC1 s'associe à la queue poly(A) (Figure 6). Par contre, la déadénylation est favorisée lorsque PABPC1 interagit avec les facteurs impliqués dans la déadénylation, dont Pan3, TOB et GW182 (EZZEDDINE *et al.*, 2007; FABIAN *et al.*, 2009).

Des données biochimiques et génétiques soutiennent le rôle de Pab1 lors de la biogenèse des ARNm chez *S. cerevisiae*. Une mauvaise maturation des ARNm et des défauts d'export sont observés chez les cellules où l'habilité de Pab1 à rentrer au noyau est perturbée (BRUNE *et al.*, 2005). Conformément à ces observations, des ARNs hyperadénylés s'accumulent dans le noyau des cellules $\Delta pab1$ (DUNN *et al.*, 2005). Il est

intéressant de mentionner qu'un phénotype similaire a été rapporté pour différents mutants affectant l'export des ARNm (JENSEN *et al.*, 2001). Par conséquent, les ARNs hyperadénylés qui s'accumulent au noyau sont plus susceptibles d'être ciblés par un mécanisme de surveillance nucléaire, notamment par l'exoribonucléase Rrp6 (DUNN *et al.*, 2005).

Deux observations suggèrent un rôle possible de PAPBC1 lors de la maturation des ARNm (HOSODA *et al.*, 2006), toutefois le rôle exact n'a toujours pas été établi. Dans un premier temps, des expériences d'immunoprécipitation d'ARN (RIP) ont démontré que PABPC1 s'associe à des pré-ARNm non-épissés et polyadénylés. Parallèlement à ces expériences, la poly(A) polymérase canonique est copurifiée avec la PABPC1.

8.2 *Poly(A)-binding protein* nucléaire (PABPN1)

Originellement, la protéine PABPN1 a été identifiée lors de l'enrichissement biochimique d'un facteur stimulant la polyadénylation à partir d'extrait de thymus de veau (WAHLE, 1991). Cette protéine conservée est caractérisée chez plusieurs organismes, toutefois aucun orthologue n'existe chez *S. cerevisiae*. L'orthologue de *S. pombe* (Pab2) a été identifié par nos travaux et la plupart des caractéristiques sont mentionnées à la section des résultats.

8.2.1 Structure et propriétés physiques

Chez les mammifères, PABPN1 est caractérisée par une région putative *coiled-coil*, un motif de reconnaissance à l'ARN (RRM) et d'un domaine riche en arginine (KÜHN et WAHLE, 2004; CHARTIER *et al.*, 2009) (Figure 10). Les dix acides aminés subséquents au codon initiateur codent pour la région de polyalanine. Toujours en N-terminal de la protéine, un domaine riche en glutamate s'y retrouve. Le signal de localisation nucléaire (NLS) de PABPN1 impliquerait les acides aminés 257-306 (Données non publiées, MALLET et BACHAND).

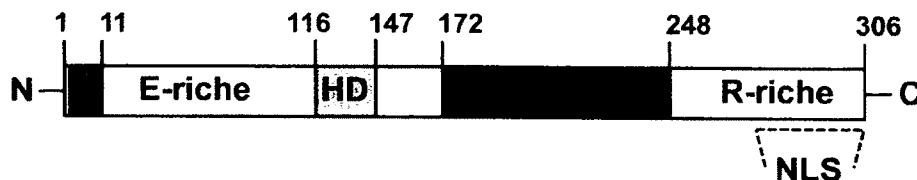


Figure 10. Structure de PABPN1.

A: Région de polyalanine; E-riche: Domaine riche en glutamate; HD: Région putative *coiled-coil*; RRM: motif de reconnaissance à l'ARN; R-riche: Domaine riche en arginine; NLS: Signal de localisation nucléaire. Figure inspirée de CHARTIER *et al.*, (2009).

Chez les humains, le transcrit de PABPN1 est entrecoupé de six introns et produit une protéine de 306 acides aminés ayant un poids moléculaire de 33 kDa. Il existe un isoforme de PABPN1 où les introns 1 et 6 ne sont pas excisés, mais la fonction de cette protéine reste encore inconnue (site web GENE: PABPN1).

PABPN1 lie étroitement les séquences poly(A) et interagit à un degré similaire aux séquences poly(G), toutefois aucune liaison n'est détectable pour des séquences poly(U) et poly(C). Afin d'observer une interaction optimale et spécifique de PABPN1 aux séquences poly(A), le motif RRM et le domaine riche en arginine sont requis (WAHLE *et al.*, 1993; KÜHN *et al.*, 2003). Il est à noter que les 13 résidus d'arginine, situés dans le domaine riche en arginine, sont diméthylés asymétriquement par PRMT1 PRMT3 et PRMT6 *in vitro* (FRONZ *et al.*, 2008). Cette méthylation n'influence pas l'affinité et la spécificité de la liaison de PABPN1 à l'ARNm (SMITH *et al.*, 1999; KÜHN *et al.*, 2003), toutefois l'affinité de PABPN1 à la *transportin* est réduite (FRONZ *et al.*, 2011).

Des essais de retard sur gel ont indiqué que 12 résidus d'adénosine sont nécessaires pour observer une forte affinité de PABPN1 à la séquence poly(A). Par contre, PABPN1 tend à former des oligomères en absence d'ARNm (NEMETH *et al.*, 1995). Cette oligomérisation requiert le domaine riche en arginine et pourrait impliquer la séquence de polyalanine (FAN *et al.*, 2001; KÜHN *et al.*, 2003), mais cette dernière séquence ne semble pas être suffisante pour induire l'oligomérisation de PABPN1 (FAN *et al.*, 2001).

8.2.2 Localisation

Dans les cellules à l'état stationnaire, PABPN1 se localise au noyau, mais cette protéine fait la navette entre le noyau et le cytosol (CALADO *et al.*, 2000a). Grâce au microscope électronique, l'analyse de l'anneau d'ARN de Balbiani de l'insecte *Chironomus tentans* montre que l'ARNm associé à PABPN1 reste à l'entrée du pore nucléaire et qu'une minime quantité de PABPN1 se retrouve à la face cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire (BEAR *et al.*, 2003).

8.2.3 Fonction

Tel que mentionné à la section 2.3.1.1, des essais de polyadénylation *in vitro* ont démontré que PABPN1 stimule la synthèse de la queue poly(A) par des interactions directes et simultanées avec la queue poly(A) en expansion et la poly(A) polymérase (PAP). De plus, toujours *in vitro*, PABPN1 favorise la transition distributive à processive de la PAP tout en contrôlant la taille de la queue poly(A) à 250 nt (WAHLE, 1991; KÜHN *et al.*, 2009) (Figure 11). L'activité distributive de la PAP consiste à ajouter un seul résidu d'adénosine au pré-ARNm et cette enzyme est immédiatement relâchée du pré-ARNm. Ainsi, il faut plusieurs liaisons de la PAP avec le pré-ARNm pour synthétiser une courte queue poly(A). Par contre, l'activité processive de la PAP permet d'ajouter rapidement plusieurs résidus d'adénosines (~250 A) avant que la PAP se dissocie du pré-ARNm.

L'un des éléments de preuve pour soutenir le rôle *in vivo* de PABPN1 lors de la polyadénylation nucléaire provient de l'étude utilisant la protéine NS1A du virus de la grippe. Initialement, il a été démontré *in vitro* que PABPN1 lie la protéine NS1A et que cette association inhibe l'activité processive de la PAP à synthétiser de longues queues poly(A). L'association *in vivo* de PABPN1 avec la protéine NS1A se répercute par la relocalisation de PABPN1 au nucléoplasme et cette protéine ne fait plus la navette entre le noyau et le cytosol. Étant donné que les fonctions connues de PABPN1 sont affectées par la liaison de NS1A, les ARNm de la β -actine n'ont que de petites queues poly(A) (~ 12 nt). Ainsi, la taille des queues poly(A) des ARNm de la β -actine redevient à la normale lorsque les cellules sont infectées avec une version tronquée de NS1A (CHEN *et al.*, 1999).

Durant le développement embryonnaire de *D. melanogaster*, des ARNm spécifiques sont régulés lors de la traduction par le biais de la polyadénylation cytoplasmique. Il est intéressant de noter que des mutations au gène *pabp2* causent une extension de la queue poly(A) pour des ARNm spécifiques régulés par cette polyadénylation. Ainsi, les queues poly(A) de ces transcrits cytosoliques sont raccourcies par l'action conjointe de PABP2 et de la déadénylase CCR4. Conformément à ces observations, PABP2 se localise au cytosol des ovocytes et des embryons précoces, soit l'endroit où ces ARNm sont régulés (BENOIT *et al.*, 2005).

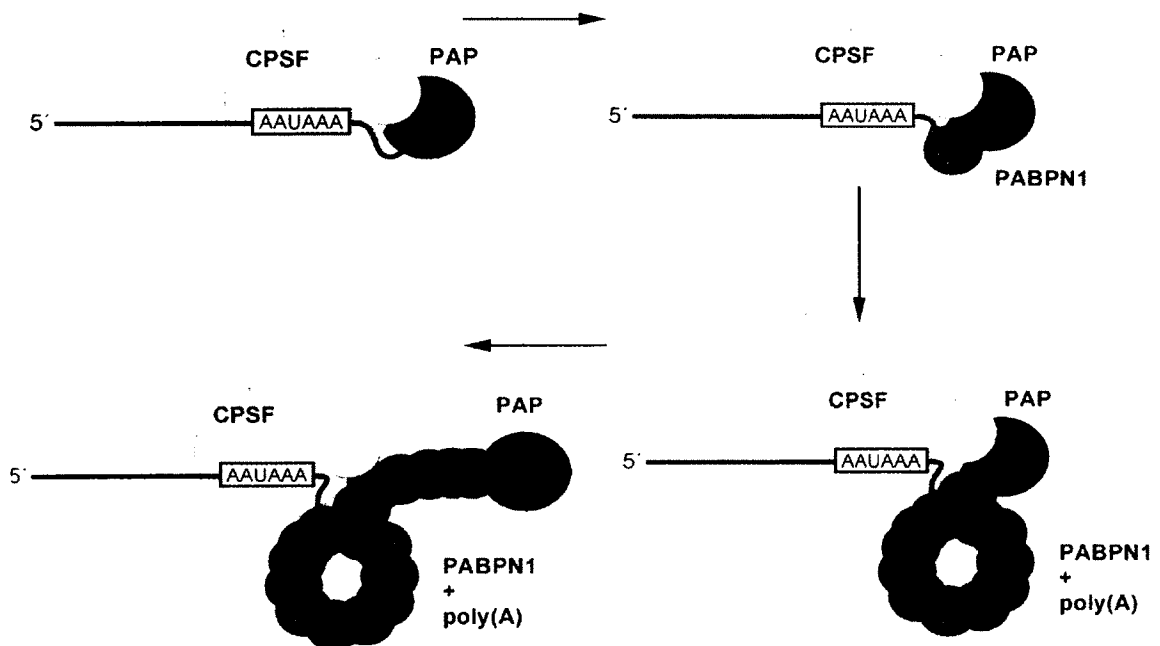


Figure 11. PABPN1 stimule la PAP et contrôle la longueur des queues poly(A).

CPSF s'associe à la séquence AAUAAA et recrute la poly(A) polymérase (PAP). Tout d'abord, la PAP synthétise une courte queue poly(A) de 10 nt et une première molécule de PABPN1 lie la queue poly(A) afin de stimuler la processivité de la PAP. La formation sphérique de la queue poly(A) avec PABPN1 assure un contact entre CPSF et PAP. Lorsque la queue poly(A) excède plus de 250 résidus d'adénosine, l'ajout supplémentaire de PABPN1 n'est plus possible. Le complexe se déstabilise engendrant l'arrêt de la polyadénylation. Figure adaptée de KÜHN *et al.*, (2009).

Selon différentes expériences réalisées par le groupe de Maquat, PABPN1 serait toujours liée aux ARNm lors du premier tour de traduction, soit le mécanisme qui cible la présence de codons stop prématurés aux ARNm nouvellement synthétisés. Pour supporter ce point, PABPN1 co-immunoprécipite avec CPB80 (ISHIGAKI *et al.*, 2001), une protéine qui s'associe à la coiffe de l'ARNm uniquement au premier tour de traduction. Une fois que le premier tour de traduction est complété, un réaménagement protéique entraîne le remplacement de PABPN1 par PABPC1. Par conséquent, PABPN1 ne jouerait pas un rôle lors de la traduction active des ARNm (SATO et MAQUAT, 2009).

8.2.4 Implication médicale

L'intérêt de caractériser la protéine PABPN1 provient du fait qu'une forme altérée de cette protéine cause une pathologie: la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD). L'OPMD est une maladie caractérisée par la chute progressive des paupières, des difficultés de déglutition et une faiblesse des membres proximaux. Les symptômes rattachés à cette maladie apparaissent tardivement, soit autour de 50-60 ans. Cette maladie a une prévalence au Québec de 1:1000 et de 1:600 pour les populations juives (BRAIS, 2003). La forme autosomique dominante de cette maladie est causée par de petites expansions (2-7) d'un trinuéclotide (GCG) codant pour l'alanine. L'ajout d'alanines a lieu dans la région de polyalanine de PABPN1. La signature de cette maladie se caractérise par la présence d'inclusions intranucléaires filamenteuses dans les fibres musculaires squelettiques (TOMÉ *et al.*, 1997).

Certains groupes ont démontré que les inclusions intranucléaires filamenteuses contiennent une grande quantité d'ARNs polyadénylés et des composantes de la voie d'ubiquitine du protéasome, notamment l'ubiquitine et la sous-unité catalytique du protéasome 20S (CALADO *et al.*, 2000b). Une large étude du transcriptome sur des patients et des modèles de souris et de drosophile ayant la maladie ont permis d'identifier, par des analyses informatiques, que le complexe ubiquitine-protéasome est significativement dérégulé. Conformément à ces analyses informatiques, la forme altérée de PABPN1 accumule et génère des agrégats lorsque l'activité du protéasome est altérée par

des drogues spécifiques (ANVAR *et al.*, 2011).

Des propriétés biophysiques de la séquence polyalanine suggèrent qu'elle jouerait un rôle important pour l'accumulation de PABPN1 dans les inclusions (BRAIS, 2003). Il semblerait que l'ampleur des symptômes musculaires causés par la forme altérée de PABPN1 dépendrait du niveau d'expression de cette dernière (HINO *et al.*, 2004). Ainsi, la faiblesse musculaire pourrait être liée à une augmentation du taux de transcription du gène altéré par rapport au gène normal. Par conséquent, le nombre de répétitions d'alanine n'est manifestement pas corrélé à la faiblesse musculaire (SCHRÖDER *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, aucune information moléculaire n'explique clairement la relation entre la mutation de PABPN1 et la pathologie d'OPMD.

9. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Chez les eucaryotes, la presque totalité des ARNm possède une queue poly(A) en 3' et cette structure joue un rôle important pour l'export nucléaire, la stabilité et la traduction des ARNm. Deux classes de *poly(A)-binding protein* (PABP) lient la queue poly(A) des ARNm: soit PABPC1 au cytosol et PABPN1 au noyau. L'orthologue de PABPC1 a bien été caractérisé chez la levure à fission tandis que l'orthologue de PABPN1 n'avait toujours pas été identifié. Toutefois, des résultats obtenus lors de l'analyse par la purification d'affinité avec la protéine d'arginine méthyltransférase I (Rmt1) couplée à la spectrométrie de masse ont permis d'identifier l'orthologue de PABPN1 chez la levure à fission. Des analyses préliminaires et des alignements de séquences ont démontré que la protéine Pab2 correspond à l'orthologue de PABPN1.

10. OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif général de mes travaux de doctorat était d'exploiter la puissance de la génétique des levures pour caractériser *in vivo* les fonctions de la *nuclear poly(A)-binding protein* Pab2 chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*. Le premier objectif consistait à caractériser la protéine Pab2 tout en se référant aux propriétés connues de la PABPN1.

Précédemment, des études *in vitro* avaient démontré que PABPN1 était impliquée dans la polyadénylation des pré-ARNm puisqu'elle stimule la processivité de la poly(A) polymérase tout en contrôlant la taille des queues poly(A) (WAHLE, 1991 et 1995b). Selon cette information, le deuxième objectif était de caractériser l'implication de Pab2 durant la maturation du pré-ARNm.

Une analyse génomique a établi que Pab2 régule l'expression de certains transcrits, tels que les gènes méiotiques, les snoRNAs, les rétrotransposons et le gène encodant la protéine ribosomale de la grande sous-unité, Rpl30-2. L'ultime objectif était de caractériser le rôle de Pab2 dans la régulation de l'expression de Rpl30-2 et de vérifier si cette régulation est généralisée à d'autres transcrits.

RÉSULTATS

CHAPITRE 1

REGULATION OF THE NUCLEAR POLY(A)-BINDING PROTEIN BY ARGININE METHYLATION IN FISSION YEAST

Audrey Perreault*, Caroline Lemieux* et François Bachand

Publié dans

The Journal of Biological Chemistry (2007) 282, 7552-7562

* Ces auteures ont contribué de façon égale à cette publication

RNA group/Groupe ARN, Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada.

CONTRIBUTION

J'ai réalisé une partie des expériences, notamment les différents *spot assay*, les différents essais de liaison *in vitro* et quelques Western Blot. J'ai fait le montage de quelques figures pour cet article.

RÉSUMÉ

Deux classes de *poly(A)-binding protein* (PABP) structurellement différentes lient la queue poly(A) des ARNm chez la plupart des cellules de mammifère: PABPC1 au cytosol et PABPN1/PABP2 au noyau. Considérant que les orthologues de PABP cytosolique de la levure sont caractérisés, le gène homologue de PABPN1 n'avait pas été identifié. Dans ce papier, nous rapportons l'identification de l'homologue de PABPN1 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* et son association à la protéine d'arginine méthyltransférase I (Rmt1). Le gène *pab2* code pour une protéine nucléaire non-essentielle qui lie spécifiquement des séquences poly(A) *in vitro*. Conformément à un rôle de Pab2 lors de la synthèse de la queue poly(A), les ARNm provenant de cellules *pab2* Δ sont hyperadénylés. Aussi, nous démontrons que les résidus d'arginine présents dans le domaine riche en arginine de Pab2 sont méthylés par Rmt1. Cette modification post-traductionnelle de Pab2 n'affecte ni sa localisation nucléaire, ni son affinité aux séquences poly(A), ni la taille des queues poly(A). Par contre, les niveaux d'oligomérisation de Pab2 sont nettement augmentés lorsque Pab2 n'est plus méthylée. La surexpression de Pab2 réduit significativement la croissance et ce retard est exacerbé dans les cellules Δ *rmt1*. Nos résultats indiquent que la principale fonction de Pab2 est de contrôler la taille de la queue poly(A), et que la méthylation d'arginines régule l'oligomérisation de Pab2.

ABSTRACT

Two structurally different poly(A)-binding proteins (PABP) bind the poly(A) tract of mRNAs in most mammalian cells: PABPC in the cytoplasm and PABP2/PABPN1 in the nucleus. Whereas yeast orthologs of the cytoplasmic PABP are characterized, a gene product homologous to mammalian PABP2 has not been identified in yeast. We report here the identification of a homolog of PABP2 as an arginine methyltransferase 1 (RMT1)-associated protein in fission yeast. The product of the *S. pombe pab2* gene encodes a nonessential nuclear protein and demonstrates specific poly(A) binding *in vitro*. Consistent with a functional role in poly(A) tail metabolism, mRNAs from *pab2*-null cells displayed hyperadenylated 3' ends. We also show that arginine residues within the carboxy-terminal arginine-rich domain of Pab2 are modified by RMT1-dependent methylation. Whereas the arginine methylated and unmethylated forms of Pab2 behaved similarly in terms of subcellular localization, poly(A) binding, and poly(A) tail length control; Pab2 oligomerization levels were markedly increased when Pab2 was not methylated. Significantly, Pab2 overexpression reduced growth rate and this growth inhibitory effect was exacerbated in *rmt1*-null cells. Our results indicate that the main cellular function of Pab2 is in poly(A) tail length control and support a biological role for arginine methylation in the regulation of Pab2 oligomerization.

INTRODUCTION

The 3' end of nearly all eukaryotic mRNAs harbors a poly(A) tail. Whereas numerous studies indicate that the presence of a poly(A) tail on a eukaryotic mRNA is required for efficient nuclear export, RNA stability, and translational control (1), recent findings have questioned the direct role of the poly(A) tail in specific steps of mRNA metabolism (2-4). The length of this stretch of polyadenosines is controlled in a species-dependent manner with average lengths of 70- and 250-nucleotides in yeast and mammals, respectively (5,6). Yet, the exact mechanism that controls poly(A) tail length remains elusive. mRNA poly(A) tail synthesis involves at least 20 different proteins in the yeast *S. cerevisiae*. The cleavage factors I and II (CF I & II) are first responsible for the cotranscriptional cleavage of the pre-mRNA, which is then followed by the polyadenylation of the upstream fragment by members of the cleavage/polyadenylation factor (CPF) complex, including the poly(A) polymerase Pap1 (7-9). In the presence of a protein with poly(A) binding activity, CF I/II, CPF, and Pap1 are sufficient to reconstitute poly(A) tail synthesis *de novo* on an RNA *in vitro* (10-12). Despite remarkable similarities in the polyadenylation machinery between yeast and mammals, species-specific factors have been described. Particularly, the product of the *pabp2/pabpn1* gene is thought to be specific to metazoans (13), as no apparent yeast homolog has yet been identified.

PABP2 was originally identified through biochemical enrichment of a polyadenylation stimulatory factor from calf thymus extracts (14). Mammalian PABP2 is characterized by a putative coiled-coil region, a single RNA recognition motif (RRM), and a carboxy-terminal arginine-rich domain (6,13). The affinity of PABP2 to synthetic poly(A) tails is in the nanomolar range and requires both the RRM and the C-terminal arginine-rich domain for optimal and specific interaction with poly(A) (15,16). Experiments using *in vitro* polyadenylation assays led to a model in which PABP2 stimulates processive poly(A) synthesis by direct and simultaneous interactions with the growing poly(A) tail and the poly(A) polymerase (17). Although *in vitro* experiments have provided information about the biochemical properties of PABP2, little is known about the mechanism by which it regulates poly(A) tail synthesis *in vivo*. A *Drosophila* system was recently established to address the function of PABP2 *in vivo*. These studies provided evidence for the critical role

of PABP2 during embryonic development as well as an unsuspected role in the regulation of cytoplasmic polyadenylation (18). An understanding of the *in vivo* mechanism by which PABP2 regulates polyadenylation is significant, because the human genetic disorder oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is linked to mutations in the *pabp2* gene (19). A physiological hallmark of this disorder is the accumulation of fibrous inclusions in the nuclei of skeletal muscle fibers that consist of PABP2 aggregates (20). Yet, the molecular defects in PABP2 function that lead to the establishment of this disease remain unclear. Mammalian PABP2 is also subject to a posttranslational modification where specific arginine residues are methylated (21). How arginine methylation modulates the function of PABP2 as well as the cellular methyltransferase responsible for PABP2 methylation remains unknown.

Protein arginine methyltransferases (PRMT) catalyze the monomethylation of specific arginine residues in proteins using S-adenosyl-L-methionine as a methyl donor. PRMTs are divided into two major classes depending on the type of dimethylarginine they generate: type I PRMTs modify proteins by the catalysis of asymmetric N^G - N^G -dimethylarginine, whereas type II PRMTs catalyze the formation of symmetric N^G - N^G -dimethylarginine (22). *prmt*-encoding genes have been identified from the sequenced genomes of yeast, worms, flies, plants, and mammals; but not prokaryotes.

The biological role of PRMTs is likely mediated by the modification of substrate proteins. Accordingly, extensive large-scale efforts have aimed to identify arginine methylated proteins (23-25). Based on these and other studies, arginine methylation appears to impact a variety of cellular processes including ribosome biosynthesis (26), T-cell activation (27), cytokine and interferon signaling (28), cell differentiation (29), and DNA repair (30). The role of arginine methylation in these cellular pathways is likely regulated by biochemical activities such as protein-protein interactions (31,32), protein subcellular localization (33,34), transcription and chromatin remodeling (35,36), mRNA metabolism (37,38), and translation (26,39). Not unexpectedly, mice engineered for deletion of the *prmt1* (40), *prmt4* (41), or *prmt5* (42) gene are inviable. Yet, our understanding of the

biological role of each PRMT and how arginine methylation alters the biological function of proteins is limited by the few physiological substrates identified to date.

In this study, we report the identification of a nuclear poly(A)-binding protein (Pab2) in fission yeast. Our results reveal that *pab2*-null cells produce hyperadenylated mRNAs and are cold-sensitive. We also demonstrate that the protein arginine methyltransferase 1 (RMT1) is the enzyme responsible for Pab2 arginine methylation. Experiments to determine the effect of methylation on Pab2 function indicate that the oligomerization levels of Pab2 are increased when it is not methylated. Accordingly, we found that the growth inhibitory effect caused by Pab2 overexpression is exacerbated in *rmt1* Δ cells. Our results thus establish Pab2 as an important regulator of poly(A) tail length control and support a model in which the oligomerization-dependent cellular toxicity of Pab2 is modulated by arginine methylation.

MATERIALS AND METHODS

Strains, growth media, and genetic methods. The complete list of the *Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study is given in Table I. Cells were grown at 30°C in yeast extract medium with amino acid supplements (YES) and Edinburgh minimum medium (EMM) containing appropriate amino acid supplements. *S. pombe* cells were transformed with plasmids and PCR products by the lithium acetate method. Disruption of *pab2* was performed by PCR-mediated gene targeting using 100-nt oligonucleotides with 80-nt from the appropriate regions of the *pab2* genomic sequence (43). The oligonucleotide sequences used for the construction of these strains are available upon request. Following transformation of a diploid strain, G418-resistant colonies were screened for *pab2* heterozygosity by colony-PCR. Meiosis and sporulation were induced in selected heterozygote diploids by plating on malt extract agar and tetrads were dissected with a micromanipulator (MSM 200, Singer Instruments, UK). *nmt1*⁺-dependent gene expression was repressed by the addition of 15 µM thiamine to the growth medium.

Table I. *Schizosaccharomyces pombe* strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
FBY13	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1</i>	26
FBY1	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 RMT1Δ::KanMX6</i>	26
FBY2	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 RMT3Δ::KanMX6</i>	26
FBY3	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 RMT5Δ::KanMX6</i>	26
FBY106	<i>h+ ade6 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 (spore A)</i>	this study
FBY107	<i>h- ade6 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 pab2::kanMX6 (spore B)</i>	this study
FBY108	<i>h- ade6 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 (spore C)</i>	this study
FBY109	<i>h+ ade6 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 pab2::kanMX6 (spore D)</i>	this study

Plasmid constructs. The cDNAs encoding *S. pombe pab2* and *pab2ΔC28* (amino acid 1-138) were amplified by RT-PCR using total cellular RNA extracted from fission yeast. The amplifications were performed using the same forward primer 5'- CCTAGCTA GCAGTGATCAAGATGCCTTAGA-3' and the 5'-CGCGGATCCCTAATACGGAGCGA AACCACG-3' and 5'-CGCGGATCCCTAGCTCATACCAGGAACGTTTGTCC-3' reverse primers, respectively. Following digestion of the 5' and 3' ends of the cDNAs with

NheI and *BamHI*, respectively, the cDNAs were cloned into *NheI/BamHI*-digested pREP2 and pREP82 vectors (44) that contain the DNA sequence encoding for a single myc-epitope tag. The *pab2* cDNA was also cloned into *BamHI*-digested pREP41EGFP-N (45) using the primer pair 5'-CGCGGATCCGAGTGATCAAGATGCC TTAGA-3' and 5'-CGCGGATCCCTAATACGGAGCGAAACCACG-3'. pGEX4T2-Pab2 and pGEX4T2-Pab2 Δ C28 were generated by PCR-amplification using pREP82myc-PAB2 as a template and the forward primer 5'-CGCGGATCCAGTGATCAAGATGCCT TAGA-3' and the reverse primers 5'-CGCGGATCCCTAATACGGAGCGAAACCACG-3' and 5'-CGCGGATCCC TAGCTCATACCAGGAACGTTTGTCC-3', respectively. EP41EGFP-N-RMT5 was generated by RT-PCR amplification of the *rmt5* cDNA using the primer pair 5'-CGCGGATCCGTTATTGCGGGATGGCCGT-3' and 5'-CGCGGATCCTTAATACATA TTACACGAG-3' both containing *BamHI* restriction sites. The PCR-amplified sequences were verified by automated sequencing at the University of Calgary DNA Core Facility.

Antibodies. Rabbit polyclonal antibodies specific to fission yeast RMT1 and RMT3 were raised at Covance Research Products (Denver, PA, USA) against GST-fusion proteins purified from *E. coli*. Rabbit polyclonal myc antibody A-14 and the mouse monoclonal anti-GST B-14 were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Asymmetric dimethylarginine-specific rabbit polyclonal antibody (ASYM24) was from Upstate (Charlottesville, VA, USA) and the rabbit polyclonal anti-GFP was from Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

Immunoprecipitation experiments. Thirty to fifty ml of mid-log phase fission yeast cells grown in either YES or EMM were used for immunoprecipitation experiments. Cells were lysed in ice-cold PBS-MT (1X PBS supplemented with 2 mM MgCl₂ and 1% triton-X-100) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche) with a Fastprep FP120 (Thermo Electro Corp.) using 0.5 mm glass beads. Clarified lysates were normalized for total protein concentration using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Inc.) and 1 mg of total proteins were subjected to immunoprecipitation using agarose-conjugated anti-myc (9E10; Santa Cruz Biotech). Immunoprecipitated proteins were eluted in sample buffer, separated on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and analysed by immunoblotting.

Microscopy. For localization of GFP-Pab2, FBY13 and FBY1, cells that were previously transformed with pREPEGFP-N-Pab2 were grown to saturation in EMM containing 15 μ M thiamine. Cells were then washed twice to remove the thiamine and allowed to grow for 18-20h before direct fluorescence microscopy. The nuclei of cells were stained using Hoechst 33342 (Sigma, St-Louis, MO).

Recombinant protein expression and *in vitro* pull-down assays. GST, GST-Pab2, and GST-Pab2 Δ C28 were expressed in *E. coli* BL21 DE3 cells (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Protein expression was induced by the addition of 0.5 mM isopropyl-1- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3h at 37°C for GST and GST-Pab2 Δ C28, and for 18h at 18°C for GST-Pab2. Following centrifugation of the cells and subsequent washing in ice-cold phosphate buffer saline (PBS), the bacterial cells were broken by sonication and the cell membranes were solubilized by the addition of triton X-100 to a final concentration of 1%. The cell debris was sedimented by a 10-min centrifugation at 12,000 rpm at 4°C, and the clarified lysates were subjected to glutathione-sepharose resin (Amersham Pharmacia Biotech). After extensive washing, the proteins were eluted from the resin by incubating with 10 mM reduced glutathione resuspended in Tris-Hcl pH 8.6; 250 mM NaCl; 0.1% triton X-100. The proteins were aliquoted and stored at -80°C.

For poly(A) pull-down experiments, 2 mg of recombinant protein or 0.5 mg of total cell extracts were incubated for 1h at 4°C with 15 ml of poly(A)-sepharose 4B (Sigma) that had been previously pre-equilibrated in buffer A (50 mM tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 0.1% Triton-X-100; 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM EDTA). The beads were then washed three times with 1 ml of buffer A and the bound proteins eluted by incubating for 5 min at 95°C in SDS-PAGE sample buffer. For the oligonucleotide polymers competition experiment, 10-fold excess of polyadenylic or polycytidylic acids (Sigma) were added to poly(A) sepharose simultaneously with GST-Pab2. The copurification of the different proteins with poly(A) sepharose was analyzed by immunoblotting.

RNA analyses. cDNA synthesis from fission yeast total RNA was as previously described (46) with the exception that the Omniscript reverse transcriptase (Qiagen) was used. cDNAs were PCR amplified with Taq DNA polymerase (NEB) using the following oligonucleotides sets: forward 5'-CCTAGCTAGCAGTGATCAAGATGCCTTAGA-3' and reverse 5'-CGCGGATCCCTAATACGGAGCGAAACCACG-3' primers for *pab2*, and forward 5'-CCATGTTTTGCGCTAGAGCAGGC-3' and reverse 5'-CTTCTGAAACAGGCTCGCGAT-3' primers for *rmt1*.

Poly(A) tail length analyses were based on a previously described method (47). Briefly, 1 µg of total fission yeast RNA was 3'-end labeled at 4°C for 18-20 h with 25 µCi of [³²P] cytidine-biphosphate using T4 RNA ligase (Ambion). Following digestion of RNAs with RNases T1 and A, the remaining poly(A) tails were ethanol precipitated after proteinase K and phenol-choloform treatments. Poly(A) tracts were separated on 8% acrylamide-7M urea gels and analyzed using a STORM 860 (Molecular dynamics).

RESULTS

A gene product similar to nuclear poly(A)-binding proteins copurifies with the fission yeast protein arginine methyltransferase 1 (RMT1).

An affinity purification approach was used to identify novel RMT1-binding proteins in the fission yeast *S. pombe*. Homologous recombination-mediated gene tagging generated a strain that expresses carboxy-terminal TAP-tagged RMT1 from its endogenous promoter. Following tandem purification and analysis of the eluted protein mixture by mass spectrometry, peptides corresponding to several RNA recognition motif (RRM)-containing proteins were identified (Table II). Inspection of the amino acid sequence of the uncharacterized *spbc16e6.12c* gene revealed extensive similarity to nuclear poly(A)-binding proteins: a predicted coiled-coil domain consisting of regularly-spaced aliphatic residues, a single RNP-type RRM, and a C-terminal arginine-rich domain (Fig. 1).

Table II. Proteins identified by LC-MS/MS from RMT1-TAP purification

<i>S. pombe</i>	ORF number	MW (kDa)	(n) ^a
RMT1	SPAC890.07c	39	46
SPBC16E9.12c	SPBC16E9.12c	20	8
Tif31/p135	SPBC530.06c	132	6
rpL7	SPBC18H10.12c	29	5
Gar1	SPBC25H2.01c	20	4
Bcr1	SPBC582.05c	98	4
Rad18	SPCC5E4.06	130	4
rpL32	SPBC16C6.11	15	3
Gar2	SPAC140.02	53	2

^a Number of unique tryptic peptides identified from each protein by mass spectrometry

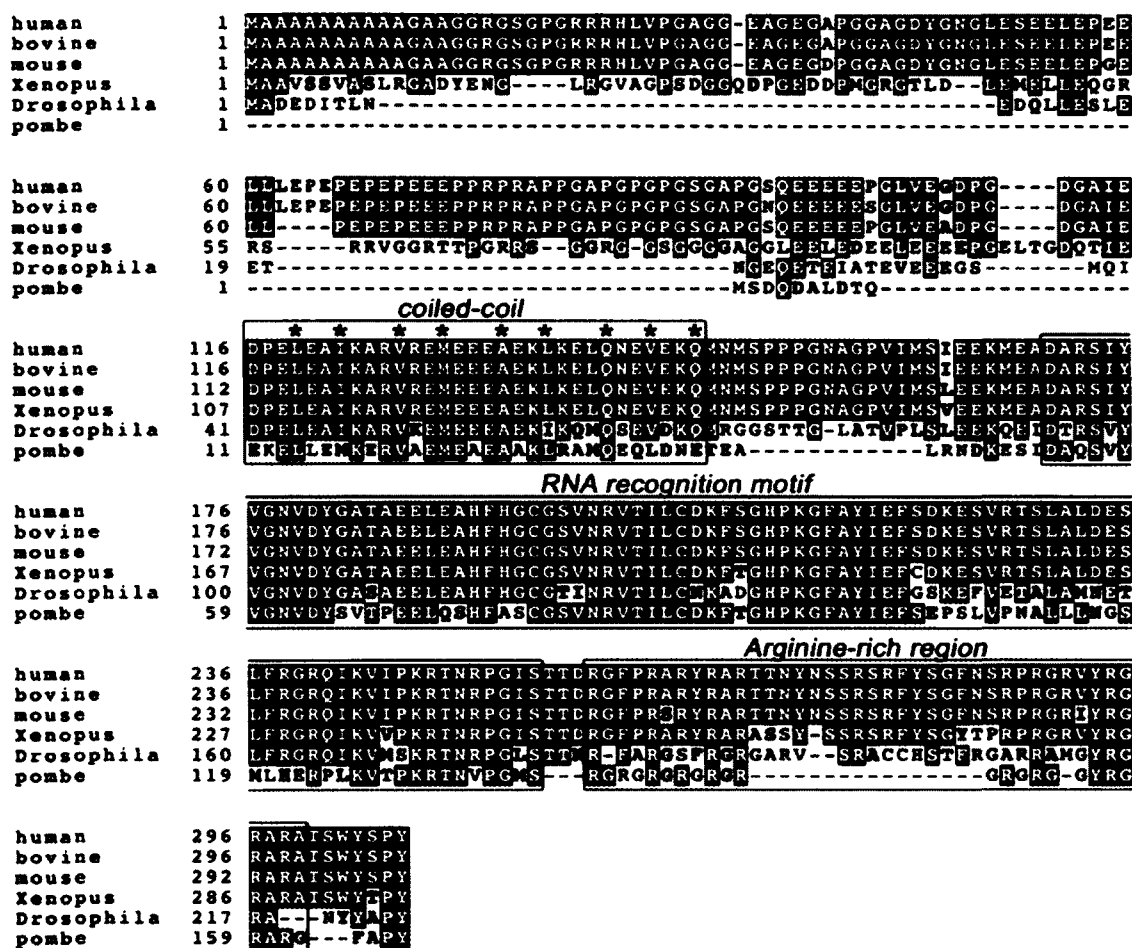


Figure 1. Amino acid sequence alignment of nuclear poly(A)-binding proteins from multiple species.

Identical amino acids are shown in black outline and similar amino acids are shown in grey outline. The predicted coiled-coil region, RNA recognition motif, and arginine-rich region are boxed. An asterisk (*) is present over the canonical aliphatic residues forming the core of the heptad repeats that constitute the coiled-coil sequence. The Genbank accession numbers used for the alignment are as follows: NP_004634.1 for humans; Q28165 for bovine; NP_062275.1 for mouse; AF257236 for *Xenopus*; AF116341 for *Drosophila*; CAB16904.1 for *S. pombe*. Alignments and shading were generated using ClustalW and Boxshade, both available via the World Wide Web.

Similarly to the *Drosophila* nuclear poly(A)-binding protein (PABP2), the *S. pombe* *spbc16e6.12c* gene product is considerably shorter than metazoan PABP2 proteins due to the lack of an amino-terminal region rich in alanine, glycine, glutamic acid, and proline residues. Fission yeast SPBC16E6.12C shares 47% identity and 66% similarity with human PABP2. We therefore named the *S. pombe* *spbc16e6.12c* gene *pab2* on the basis of this homology. Sequence searches did not find any *pab2* ortholog in the *S. cerevisiae* genome.

A construct expressing myc-tagged Pab2 was generated to validate our large-scale affinity purification results and examine whether RMT1 could coimmunoprecipitate with *S. pombe* Pab2. The myc-Pab2 construct was used to transform wild-type as well as cells in which the genomic copy of the *rmt1*, *rmt3*, or *rmt5* arginine methyltransferase-encoding gene was deleted. Total cells extracts prepared from the different yeast cultures were subjected to immunoprecipitation using a monoclonal myc antibody and analyzed by immunoblotting using various antibodies. As can be seen in Figure 2, RMT1, but not RMT3, was found to coprecipitate with myc-Pab2 in extracts prepared from wild-type cells (lane 7). As controls, myc immunoprecipitates prepared from extracts of vector-transformed (lane 6) and *rmt1*-null cells that expressed myc-tagged Pab2 (lane 8) did not recover RMT1. Deletion of the *rmt3* or *rmt5* coding sequence did not perturb the association between RMT1 and Pab2 (Fig. 2; lanes 9 and 10, respectively). These results are consistent with our tandem affinity purification data and indicate that the arginine methyltransferase RMT1 associates with Pab2 in fission yeast.

Pab2 is asymmetrically dimethylated by RMT1.

The C-terminal arginine-rich region of human PABP2 is dimethylated at arginines by PRMT1 and PRMT3 *in vitro* (21); yet, the physiological methyltransferase responsible for PABP2 methylation remains to be determined. Given the specific association between RMT1 and Pab2 (Fig. 2), we examined whether Pab2 was arginine methylated in fission yeast. Extracts of cells that were previously transformed with an empty vector or a vector expressing myc-Pab2 were subjected to immunopurification using a myc monoclonal antibody.

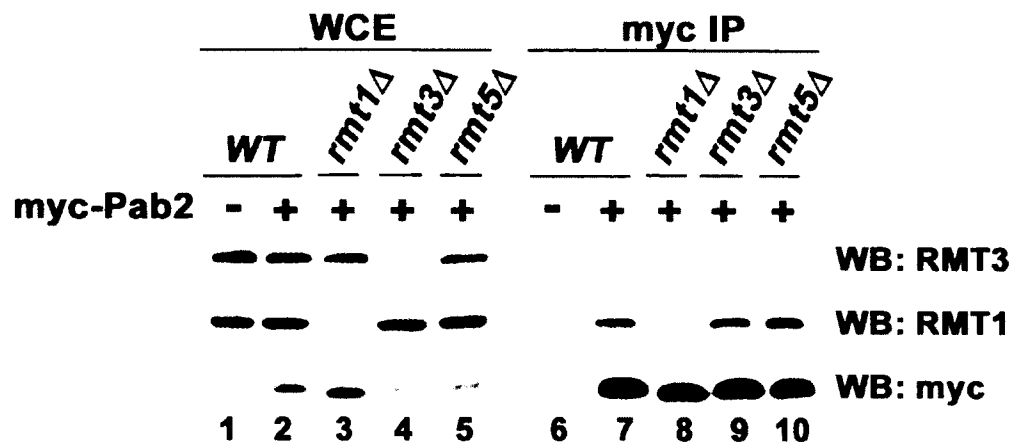


Figure 2. Specific association of Pab2 with RMT1.

Immunoblot analysis of whole cell extracts (WCE; lanes 1-5) and myc immunoprecipitates (IP; lanes 6-10) prepared from wild-type (lanes 1, 2, 6, and 7), *rmt1*-null (lanes 3 and 8), *rmt3*-null (lanes 4 and 9), and *rmt5*-null (lanes 5 and 10) cells previously transformed with a plasmid expressing myc-tagged Pab2 (lanes 2-5 and 7-10) or vector control (lanes 1 and 6). Antibodies for western blotting (WB) were rabbit polyclonal antibodies specific to RMT3, RMT1, and the myc epitope (upper, middle, and bottom panels, respectively).

Figure 3A demonstrates that similar levels of myc-Pab2 were immunoprecipitated from wild-type (lane 2; upper panel) and arginine methyltransferases-null cell extracts (lanes 3-5; upper panel), but not from vector control-transformed cells (lane 1; upper panel). An affinity-purified antibody specific for asymmetric dimethylarginines (aDMA) (33) was used to determine the methylation status of immunopurified Pab2. Reprobing of the membrane used for the myc immunoblot with the aDMA-specific antibody detected aDMA-modified Pab2 in immunoprecipitates prepared from extracts of wild-type, *rmt3*Δ, and *rmt5*Δ cells (lanes 2, 4, and 5, respectively; lower panel), but not from *rmt1*-null cells (lane 3; lower panel). Immunoblotting with a symmetric dimethylarginine-specific antibody (37) did not detect such modification in myc-Pab2 (data not shown). These results establish RMT1 as the physiological methyltransferase responsible for Pab2 arginine methylation. Furthermore, our data reveal that no alternate pathways exist to complement Pab2 methylation in the absence of RMT1 in *S. pombe*.

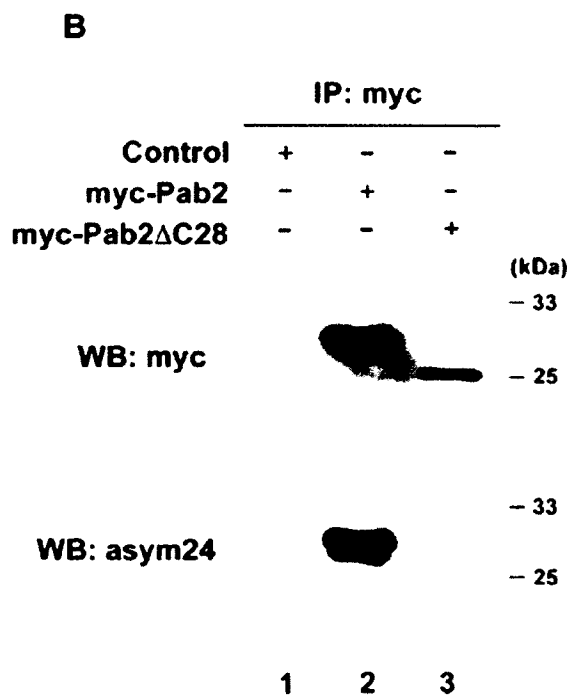
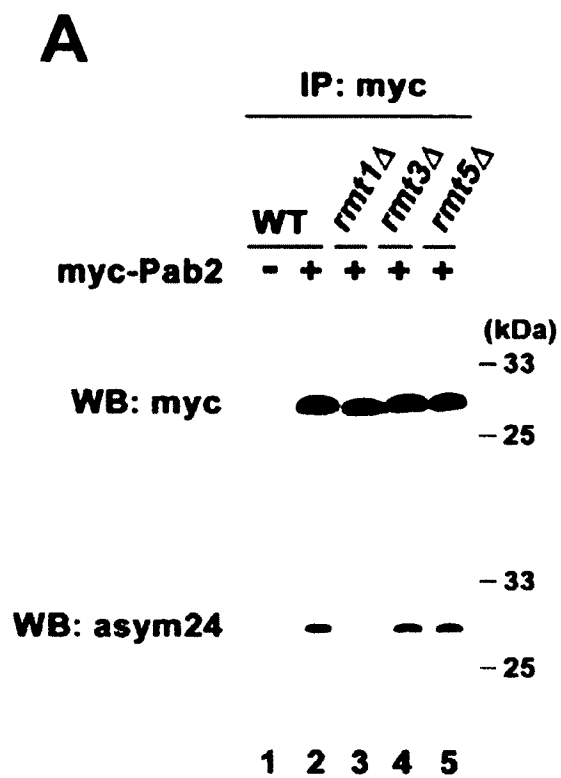


Figure 3

Figure 3. The arginine-rich domain of Pab2 is arginine methylated by RMT1.

(A) Myc immunoprecipitates (IP) prepared from extracts of wild-type (lanes 1-2), *rmt1*-null (lane 3), *rmt3*-null (lane 4), and *rmt5*-null cells (lane 5) expressing (lanes 2-5) or not expressing (lane 1) myc-Pab2, were immunoblotted with affinity-purified antibodies specific to the myc epitope (upper panel) and to asymmetric dimethylarginine (asym24; lower panel). (B) Anti-myc immunoprecipitates (IP) prepared from extracts of wild-type cells that were previously mock-transformed (lane 1) or transformed with plasmids expressing myc-Pab2 (lane 2) and a C-terminal truncated version of myc-Pab2 (lane 3) were immunoblotted with the same antibodies as in (A). The position of the 25-kDa and 33-kDa molecular weight markers is shown on the right.

We next set out to identify the region in Pab2 that is arginine methylated. The arginine-rich domain has been shown to be the methylation site of several nucleic acid-binding proteins (48), including human PABP2 (21). We therefore generated a construct that expresses a C-terminal truncated version of myc-Pab2 lacking the arginine-rich domain. As can be seen in Fig. 3B, the C-terminal truncated form of myc-Pab2 expressed in wild-type cells was not found to contain methylated arginines (lane 3; lower panel); yet, both full-length and truncated versions of myc-Pab2 were successfully immunopurified (lanes 2-3, upper panel). These results define the C-terminal arginine-rich domain as the major site of arginine methylation in fission yeast Pab2.

Fission yeast Pab2 is a nonessential nuclear protein.

We constructed a diploid strain in which one of the two *pab2* alleles was disrupted to address whether *pab2* is an essential gene in fission yeast. Germination of the spores after meiosis and tetrad microdissection resulted in a 2:2 segregation ratio of geneticin resistance (Fig. 4A), indicating that *pab2*-null cells are viable in *S. pombe*. RT-PCR was used to confirm the absence of *pab2* expression in geneticin-resistant cells. Analysis of total RNA prepared from cells derived from the dissection of tetrad 6 (Fig. 4A) demonstrated that geneticin-resistant cells from spores 6B and 6D lacked *pab2* transcripts (Fig. 4B, lanes 2 and 4), whereas geneticin-sensitive cells from spores 6A and 6C expressed *pab2* mRNAs (Fig. 4B, lanes 1 and 3). As a control, the *rmt1* transcript was detected in all cells derived

from tetrad 6 (Fig. 4B, lanes 1-4), but not from *rmt1*-null cells (lane 5). Examination of cell growth revealed that *pab2*-null cells exhibit growth defects at lower temperatures. As can be seen in Fig. 4C, cell growth of *S. pombe* deleted for the *pab2* gene is delayed at 18°C and 25°C as compared to isogenic *pab2*⁺ yeast. In contrast, both wild-type and *pab2*Δ cells grow comparably when incubated at 30°C. Thus, unlike for *Drosophila* (18), *pab2* is not essential for mitotic growth in fission yeast.

We next monitored Pab2 localization in live *S. pombe* cells using a green fluorescent protein (GFP) fusion (Fig. 4D). As shown in Fig. 4E, GFP-Pab2 localized to cell nuclei and was excluded from the cytoplasm at steady state (Fig. 4E, *a-c*). In addition, GFP-Pab2 was found to localize to single nuclear foci (Fig. 4E, *b*). A systematic analysis of all fission yeast gene products by fluorescence microscopy found similar localizations for Pab2 (49). Arginine methylation modulates the nucleocytoplasmic transport of specific proteins (33,34). We thus examined whether the absence of arginine methylation in fission yeast Pab2 affected its subcellular localization. Examination of the steady state accumulation of GFP-Pab2 expressed in *rmt1*-null cells demonstrated a similar nuclear localization profile as in wild-type cells (Fig. 4E, *d-f*). These results indicate that arginine methylation does not affect Pab2's ability to be imported into the nucleus.

Pab2 is a poly(A)-binding protein required for poly(A) tail length control.

Nuclear poly(A)-binding proteins specifically bind synthetic adenylate chains *in vitro* (15,50). Fission yeast Pab2 and a deletion mutant lacking the C-terminal arginine-rich domain were expressed in *E. coli* as glutathione-S-transferase (GST) fusions and purified on glutathione-sepharose columns to investigate their ability to bind poly(A) RNA. In poly(A) pull-down experiments, GST-Pab2 was efficiently recovered in the poly(A)-sepharose fraction (Fig. 5A, lane 8). In contrast, GST as well as the carboxy terminal-truncated form of Pab2 did not bind to the poly(A)-sepharose resin (Fig. 5A, lanes 7 and 9). These results are consistent with studies indicating that the arginine-rich C-terminal domain of mammalian PABP2 contributes to RNA binding (15).

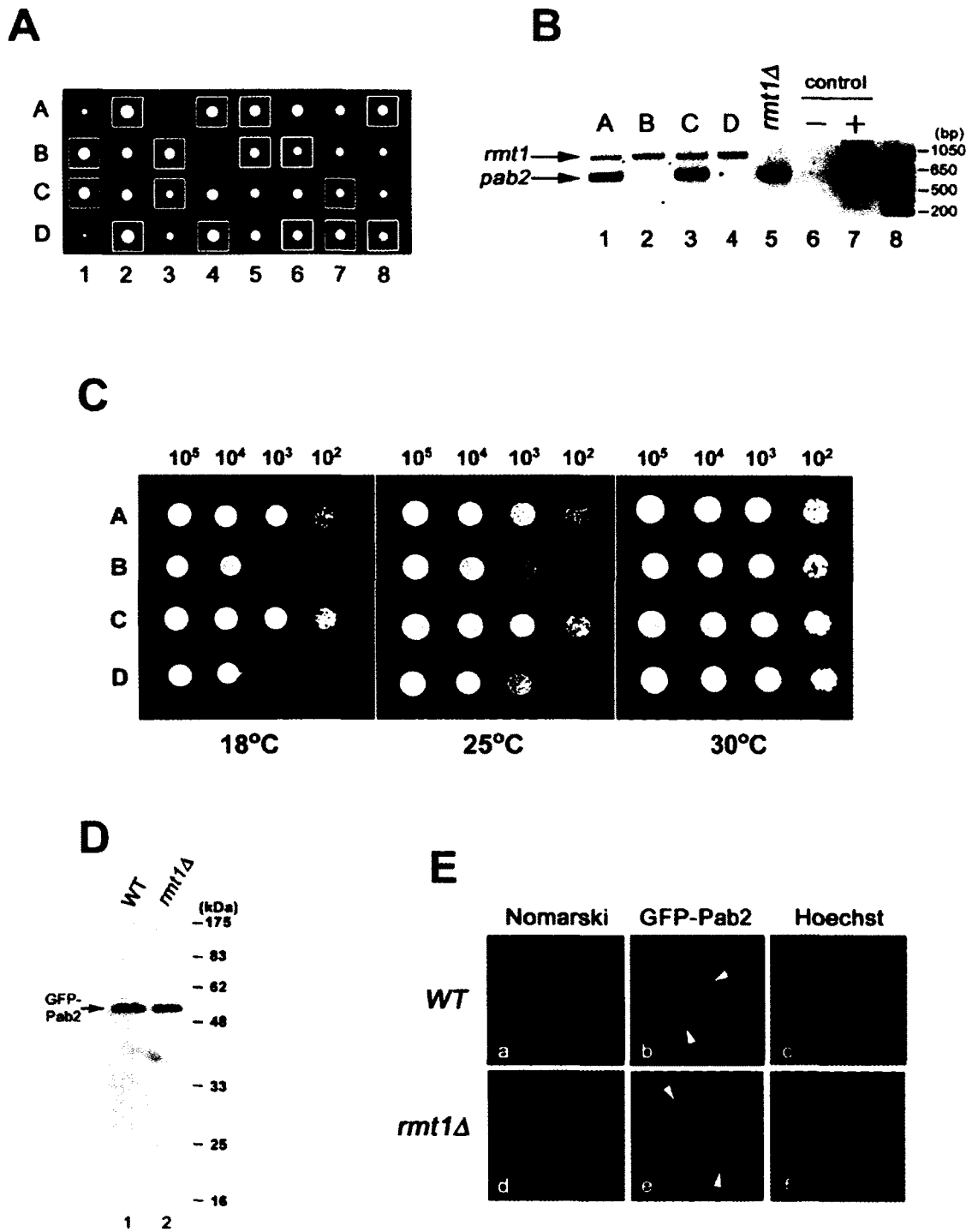


Figure 4

Figure 4. Fission yeast Pab2 is a non-essential nuclear protein.

(A) Tetrads derived from $h^+/h^- pab2::kanMX6/pab2^-$ diploid strains were microdissected onto YES agar plates. Colonies resulting from 8 such tetrads were photographed after 7 days of growth at 30°C. Geneticin-resistant colonies are boxed in white. (B) DNase-treated total RNA extracted from tetrad 6A-6D (lanes 1-4, respectively) and *rmt1*-null (lane 5) cells was analyzed for expression of *rmt1* and *pab2* mRNAs by RT-PCR. PCR amplifications with (lane 7) or without (lane 6) plasmids containing *rmt1* and *pab2* cDNAs were used as controls. Amplicons originating from *rmt1* and *pab2* mRNAs are indicated on the left. DNA molecular weight markers (lane 8) are indicated on the right in basepairs (bp). (C) Tenfold serial dilutions of tetrads 6A-6D spanning the range from 10^5 to 10^2 cells were spotted onto YES agar plates and photographed after 4 days at 25° and 30°, and 8 days at 18°C. (D) Whole-cell extracts prepared from wild-type (lane 1) and *rmt1*-null (lane 2) cells that were previously transformed with a plasmid expressing GFP-Pab2 were analyzed using an affinity-purified GFP antibody. The position of the molecular weight makers is indicated on the right in kilodaltons (kDa). (E) Localization of GFP-Pab2 in living wild-type (WT; a-c) and *rmt1*-null (*rmt1*Δ; d-f) cells grown at 30° in the absence of thiamine. Nomarski (left), GFP fluorescence (center), and Hoechst staining (right) are shown. Arrowheads point to nuclear foci.

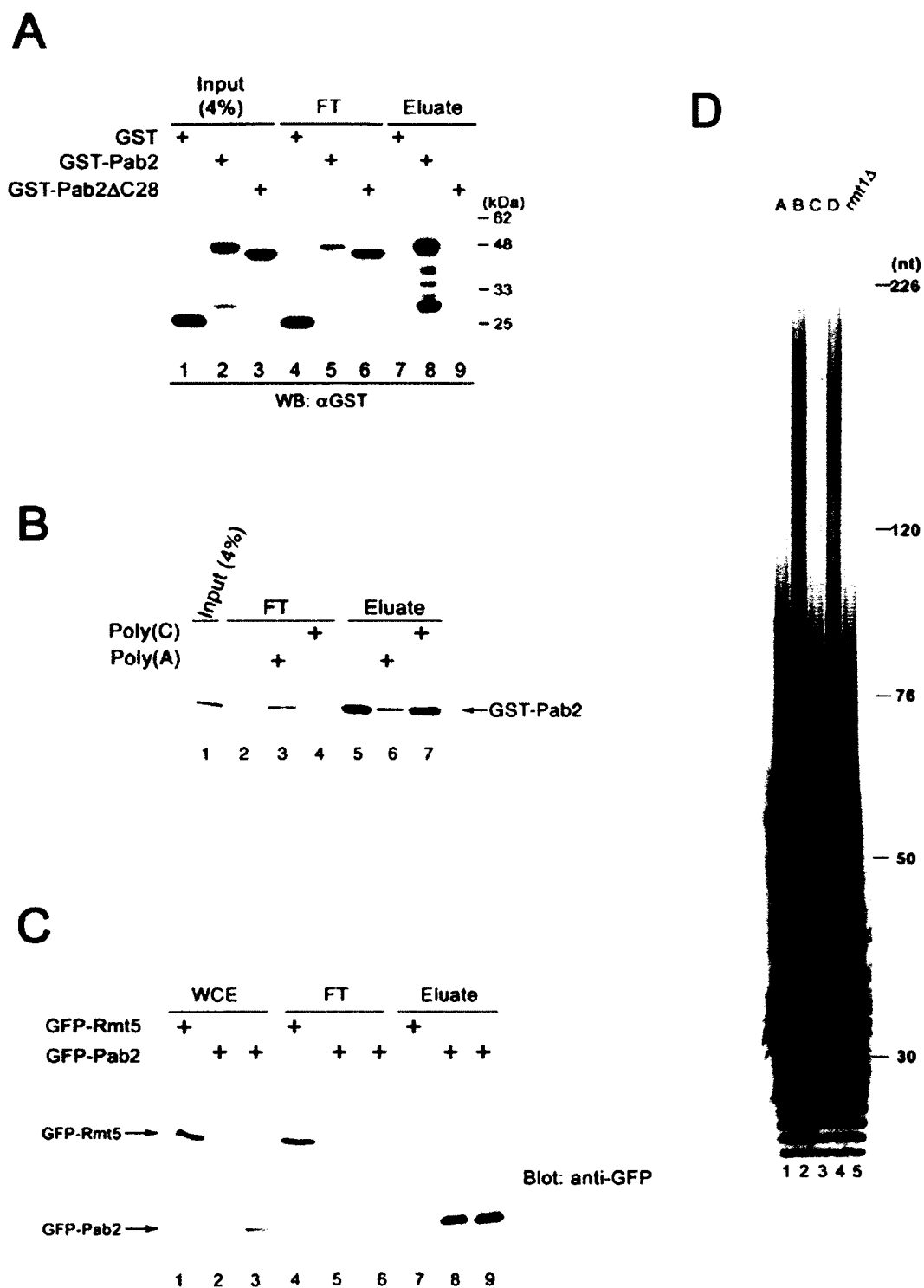


Figure 5

Figure 5. Pab2 is a poly(A) binding protein required for poly(A) tail length control.

(A) Equal amounts of purified GST (lanes 1, 4, and 7), GST-Pab2 (lanes 2, 5, and 8), and a truncated version of GST-Pab2 lacking the C-terminal arginine-rich domain (GST-Pab2 Δ C28; lanes 3, 6, and 9) were incubated with poly(A)-sepharose beads. Following a 1-hr incubation, the flow-through (FT; lanes 4-6) was collected and the beads were washed extensively before the proteins were eluted (lanes 7-9). Detection of the proteins was by Western blotting (WB) using a polyclonal GST antibody. The position of the molecular weight markers is indicated on the right in kilodaltons (kDa). (B) Equal amounts of GST-Pab2 were incubated with poly(A)-sepharose beads in the presence of a 10-fold excess of poly(A) (lanes 3 and 6), poly(C) (lanes 4 and 7), or without any competing oligonucleotides (lanes 2 and 5). Following a 1-hr incubation, the flow-through (FT; lanes 2-4) was collected and the beads were washed extensively before the proteins were eluted (lanes 5-7). Detection of GST-Pab2 was by Western blotting (WB) using a polyclonal GST antibody. (C) Equal amounts of whole cell extracts (WCE; lanes 1-3) prepared from wild-type (lanes 1-2, 4-5, and 7-8) and *rmt1*-null cells (lanes 3, 6, and 9) that were previously transformed with vectors expressing GFP-RMT5 (lanes 1, 4, and 7) and GFP-Pab2 (lanes 2-3, 5-6, and 8-9) were incubated with poly(A)-sepharose beads. Following a 1-hr incubation, the flow-through (FT; lanes 4-6) was collected and the beads were washed before the elution (lanes 7-9). Detection of the proteins was by Western blotting (WB) using an affinity-purified GFP antibody. The position of GFP-RMT5 and GFP-Pab2 is indicated on the left. (D) Poly(A) tail length was analyzed by 3' end labeling of total RNA extracted from wild-type (spores 6A and 6C; lanes 1 and 3, respectively), *pab2*-null (spores 6B and 6D; lanes 2 and 4, respectively), and *rmt1*-null (lane 5) cells. Following RNase degradation of non-poly(A) sequences, the poly(A) tails were separated by electrophoresis through a 15% polyacrylamide-8 M urea gel. The positions of 3'-end labeled DNA fragments are indicated on the right.

We then sought to examine the RNA-binding specificity of GST-Pab2. Recombinant Pab2 was added to poly(A)-sepharose with or without the addition of a 10-fold excess of specific polyribonucleotides. As can be seen in Fig. 5B, soluble poly(A) reduced the copurification of GST-Pab2 on the poly(A)-sepharose resin by more than 10-fold (compare lanes 5 and 6). Conversely, competition experiments using excess soluble poly(C) had no effect on the ability of GST-Pab2 to bind the poly(A)-sepharose resin (Fig. 5B, compare lanes 5 and 7). These results demonstrate that similarly to human and *Drosophila* PABP2 (16,50), fission yeast Pab2 binds specifically to poly(A) *in vitro*.

It was previously reported that arginine methylated mammalian PABP2 binds synthetic poly(A) chains as efficiently as unmethylated PABP2 (15). Two different sources of PABP2 were used in these binding experiments: methylated PABP2 purified from calf thymus and unmethylated PABP2 purified from *E. coli*. Because of the inherent differences associated from the use of proteins purified from such different sources, we decided to take advantage of the fact that fission yeast Pab2 expressed in *rmt1*-null cells is not arginine methylated (Fig. 3). Cell extracts prepared from wild-type and *rmt1* Δ cells expressing GFP-tagged Pab2 were incubated with poly(A)-sepharose. Following extensive washing steps, it was found that GFP-Pab2 derived from extracts of wild-type and *rmt1*-null cells bound poly(A)-sepharose with similar efficiencies (Fig. 5C, compare lanes 8-9). As a control of binding specificity, a non-poly(A) binding protein did not copurify with poly(A) chains (lane 7). Our results are therefore consistent with that of Kühn *et al* (15) and indicate that the poly(A) binding ability of Pab2 is not modulated by arginine methylation.

Once we had established that Pab2 specifically bound to poly(A) *in vitro*, we examined whether Pab2 is involved in the regulation of poly(A) tail synthesis in fission yeast. Poly(A) tail distribution was therefore analyzed by 3'-end labeling of total RNA followed by RNase digestion, leaving the poly(A) chains intact. RNAs prepared from two independent segregants in which the genomic copy of the *pab2* gene has been deleted (see Figs. 4A and 4B) showed a marked increase in the level of hyperadenylated RNAs (Fig. 5D, lanes 2 and 4) as compared to the distribution of poly(A) tails from two isogenic segregants with wild-type *pab2* alleles (Fig. 5D, lanes 1 and 3). Maximum poly(A) tail length

increased from ~120 nucleotides in wild-type cells to >226 nucleotides in *pab2*-null cells. Poly(A) tail length of RNAs prepared from *rmt1*-null cells was found to be of similar size distribution as RNAs from *pab2*⁻ cells (Fig. 5D, compare lane 5 to 1 and 3). We thus conclude that fission yeast Pab2 functions in poly(A) tail length control. Furthermore, our results suggest that the role of Pab2 in the regulation of poly(A) tail length is not influenced by arginine methylation.

Arginine methylation modulates Pab2 oligomerization.

Oligomerization of PABP2 has been linked to the formation of nuclear aggregates and cell toxicity (51). Interestingly, *in vitro* binding studies indicate that the C-terminal domain of mammalian PABP2 promotes self-association (15,51). Because our data (Fig. 3) and work of others (21) demonstrate that the C-terminal arginine-rich domain of nuclear poly(A) binding proteins is arginine methylated, we investigated the role of arginine methylation on Pab2 oligomerization. To examine the effect of Pab2 methylation on self-association, cell extracts were prepared from wild-type and *rmt1*-null cells that coexpressed GFP- and myc-tagged Pab2. Myc immunoprecipitates prepared from cell extracts were followed by immunoblot analysis using myc- and GFP-specific antibodies. Whereas GFP-Pab2 was recovered from myc immunoprecipitates prepared from extracts of yeast coexpressing myc- and GFP-tagged Pab2 (Fig. 6, lane 5), GFP-Pab2 was not detected in immunoprecipitates of control extracts that did not contain myc-Pab2 (Fig. 6, lane 4). These results are consistent with previous observations indicating that nuclear poly(A)-binding proteins form oligomers (15,51,52). Analysis of myc immunoprecipitates prepared from extracts of *rmt1*-null cells that were previously transformed with plasmids expressing myc-Pab2 and GFP-Pab2 showed a 10-fold increase in the level of GFP-Pab2 that copurified with myc-tagged Pab2 (Fig. 6, lane 6). Pab2 oligomers were RNA-independent as RNase treatment did not abolish the association between myc-Pab2 and GFP-Pab2 (data not shown). These data indicate that arginine methylation of Pab2 modulates its self-association.

Pab2 overexpression causes toxicity that is exacerbated in *rmt1*-null cells.

Mutations in the human *pabp2* gene are linked to oculopharyngeal muscular

dystrophy (OMPD) (19), a disease characterized by fibrous inclusions in the nuclei of skeletal muscle fibers (20). Interestingly, the extent of PAPB2 oligomerization is a key factor associated with the formation of nuclear aggregates found in cells of OPMD-afflicted individuals (20,51). Having established that Pab2 oligomerization was modulated by arginine methylation (Fig. 6), we investigated the biological relevance of this biochemical effect. For this, the gene dosage of *pab2* was altered by using a vector expressing Pab2 under the control of the thiamine-regulated *nmt1+* promoter. Full derepression of the *nmt1+* promoter occurs between 18-24 h following the transfer from thiamine-containing to thiamine-free medium (53). Thiamine-dependent growth defects linked to Pab2 overexpression were apparent in wild-type fission yeast (Fig. 7). The Pab2-dependent growth inhibition observed in wild-type cells required the C-terminal arginine-rich domain (Fig. 7). Importantly, *rmt1*-null cells were more sensitive than wild-type fission yeast to the growth inhibitory effect elicited by Pab2 overexpression (Fig. 7). These results indicate that overexpression of the nuclear poly(A)-binding protein leads to cellular toxicity in *S. pombe*. Furthermore, our data suggest that elevated dosage of unmethylated Pab2 is more toxic to cells than arginine methylated Pab2.

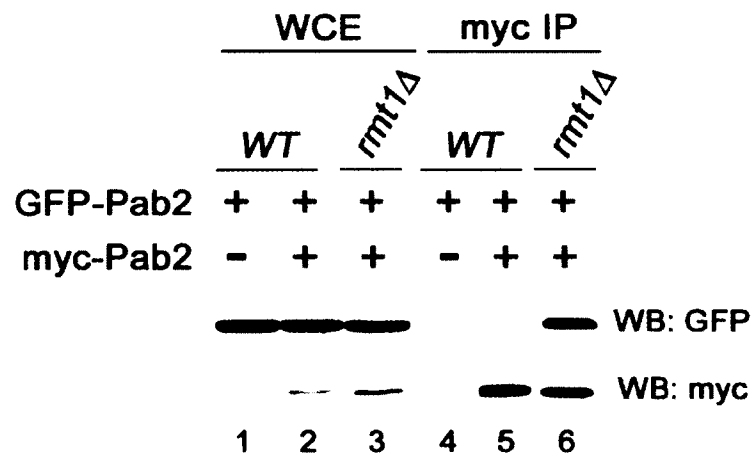


Figure 6. Regulation of Pab2 oligomerization by arginine methylation.

Western blot (WB) analysis of whole cell extracts (WCE; lanes 1-3) and myc immunoprecipitates (IP; lanes 4-6) prepared from wild-type (lanes 1, 2, 4, and 5) and *rmt1*-null (lanes 3 and 6) cells that express either GFP-Pab2 alone (lanes 1 and 4) or with myc-Pab2 (lanes 2, 3, 5, and 6). GFP- and myc-specific antibodies were used for Western blot analyses (upper and lower panels, respectively).

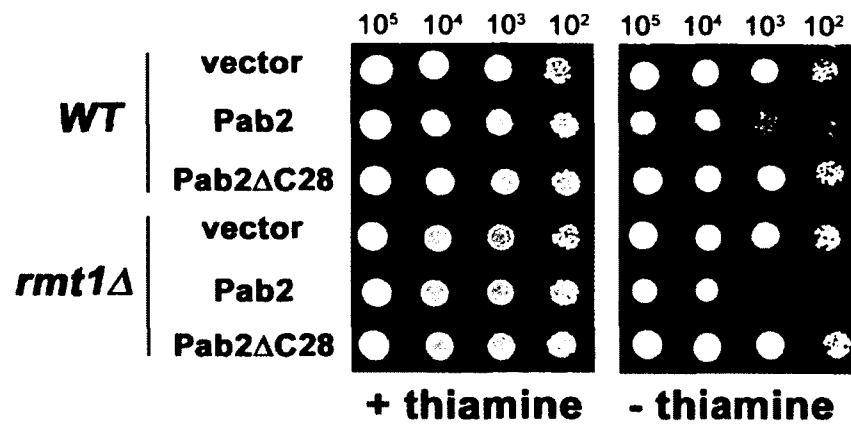


Figure 7. Pab2 overexpression induces growth inhibition that is exacerbated in *rmt1*-null cells.

Tenfold serial dilutions of wild-type (WT) and *rmt1*-null (*rmt1D*) cells that were previously transformed with a vector control, or vectors expressing wild-type and the C-terminal truncated form of Pab2 lacking the arginine-rich domain (Pab2ΔC28) were spotted onto EMM plates with (left) or without (right) thiamine.

DISCUSSION

Mechanisms of poly(A) tail synthesis have mainly been studied in the yeast *S. cerevisiae* and in mammals. Our current study establishes fission yeast as a valuable system to investigate the molecular machinery and mechanisms involved in poly(A) tail metabolism. Significantly, we believe our results provide strong evidence for the identification of a homolog of mammalian nuclear poly(A)-binding proteins (PABP2) in fission yeast. This conclusion is supported by several observations: (i) the extensive amino acid identity and similarity between *S. pombe* Pab2 and mammalian PABP2 (Fig. 1), (ii) the domain organization of fission yeast Pab2, including a coiled-coil region, a single RNA recognition motif, and a C-terminal arginine-rich domain (Fig. 1), (iii) the nuclear localization of Pab2 (Fig. 4), (iv) arginine methylation of the C-terminal arginine-rich domain (Fig. 3), (v) the ability of Pab2 to specifically and directly interact with poly(A) *in vitro* (Fig. 5), (vi) the involvement of Pab2 in poly(A) tail length control *in vivo* (Fig. 5D), and (vii) the oligomerization properties of Pab2 (Fig. 6).

Pab2 and poly(A) tail length control.

How does the absence of Pab2 expression result in excessively elongated poly(A) tails? Most of the current knowledge on poly(A) tail length control *in vivo* was gained from work using *S. cerevisiae*. Based on this biochemical and genetic evidence, models in which the major poly(A)-binding protein of budding yeast, Pab1, regulates poly(A) tail length by (i) regulating poly(A) polymerase (PAP) processivity (54) and (ii) recruiting subunits of the poly(A) nuclease (PAN) complex to achieve mRNA-specific poly(A) length control were proposed (55,56). Yet, the role of Pab1 as the primary regulator of mRNA poly(A) tail length during *de novo* synthesis has recently been debated. The poly(A)-binding protein Nab2 was also found to be a key player in the regulation of poly(A) tail synthesis in *S. cerevisiae*. This conclusion is supported by experimental evidence indicating that Nab2-depleted cells produce hyperadenylated mRNAs and that recombinant Nab2 influences poly(A) tail length control in *in vitro* polyadenylation assays (11,57). However, the exact mechanism by which Nab2 regulates poly(A) length *in vivo* remains unclear.

Evidence also links 3'-end processing to mRNA nuclear export (11,58-62). Interestingly, hyperadenylated mRNAs are found in a diverse set of *S. cerevisiae* strains defective in mRNA export (11,63,64). In these mutant strains, nuclear accumulation of hyperadenylated transcripts, and thereby cell growth, are somewhat restored by inactivating components of the nuclear exosome (59,62) and the poly(A) nuclease complex (60). On the basis of these findings, a quality control system that monitors proper 3' end formation before the release of mRNAs for nuclear export was suggested. Yet, the mechanism by which mRNAs become hyperadenylated upon inactivation of specific export factors remains to be determined.

It is therefore possible that the steady-state accumulation of hyperadenylated transcripts in *pab2*-null cells (Fig. 5) is the indirect consequence of mRNA export defects. We do not favor this interpretation, however. First, whereas all of the mRNA export factors in which hyperadenylated transcripts have been detected are essential for cell viability, *pab2*-null cells are viable (Fig. 4). Moreover, hyperadenylation is detected in a strain that expresses a cold-sensitive allele of *nab2* in which no apparent accumulation of nuclear poly(A)⁺ RNA is seen at the permissive temperature (11), implying that hyperadenylated mRNAs are not necessarily retained in the nucleus. We rather predict a model whereby Pab2 controls poly(A) tail length by directly regulating polyadenylation. Results obtained from *in vitro* assays support a model in which PABP2 promotes the transition from processive to distributive poly(A) synthesis once a specific length is reached (65). Yet, the mechanisms of length determination and polyadenylation termination remain to be determined.

In vitro data also indicate that mammalian PABP2 stimulates poly(A) synthesis by recruiting the poly(A) polymerase to the RNA substrate (17). However, detection of hyperadenylated RNAs in *pab2*-null cells indicates that factors other than Pab2 can stimulate tethering of PAP to the 3'-end of nascent transcripts as well as PAP processivity *in vivo*. The cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex has indeed been demonstrated as a stimulatory component of polyadenylation *in vitro* (66). Furthermore, it is anticipated that the C-terminal domain of RNA polymerase II modulates

poly(A) synthesis, as recent chromatin immunoprecipitation studies indicate that most mRNA maturation steps occur cotranscriptionally, including 3'-end processing and polyadenylation (67). Therefore, although PABP2 is required for efficient polyadenylation *in vitro*, our results suggest that its main role in the nucleus is in the regulation of poly(A) tail length control. In apparent contrast with this conclusion are observations of shorter, yet considerable, poly(A) tails in *Drosophila pabp2* mutants (18). From this study, it was concluded that PAP is incapable of producing stable polyadenylated mRNAs in the absence of PABP2. In this case, however, the data were obtained in mutant embryos in which appreciable amounts of maternal PABP2 are detected. The detection of hyperadenylated RNAs demonstrated in our work does not display such limitations, as yeast cells in which the genomic copy of *pab2* has been deleted show a complete absence of Pab2 expression. These potentially contradictory results may be explained by observations suggesting two independent functions for *Drosophila* PABP2, in which it appears to regulate both poly(A) tail lengthening and shortening (18). Such independent functions for PABP2 may have evolved as a requirement for regulation during fly development, which is not necessary in yeast.

Pab2 and cell viability.

Our studies reveal that *pab2* is not essential for cell viability in fission yeast (Fig. 4). This is surprising given that *pab1* and *nab2* are essential genes in *S. cerevisiae* (68). The molecular basis for the inviability of these mutants is likely to be the strong inhibition of mRNA export in the absence of Pab1 and Nab2 expression (11,34,59,60). Similarly to *pab2*, the fission yeast homolog of *S. cerevisiae* Pab1 is not essential (69). Furthermore, *pab1*-null cells do not show any detectable mRNA export defect in *S. pombe* (69). Several groups have reported that cytoplasmic Pab1 is a multi-functional protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm in yeast and humans (59,60,69,70). It is therefore possible that in *pab2*-null fission yeast, Pab1 complements some of the essential nuclear functions normally performed by Pab2. Such a model is consistent with: (i) *pab1* being a high-copy suppressor of *nab2* mutant alleles in budding yeast (11) and (ii) recent data indicating that the mammalian Pab1 homolog copurifies with poly(A) polymerase and associates with intron-containing polyadenylated transcripts (71). PABP2 is required for

cell viability and embryonic development in *Drosophila* (18). Yet, because *Drosophila* PABP2 appears to play an essential role in the expression of key cell cycle regulators in the cytoplasm, it remains uncertain whether it is PABP2's function in gene expression control or mRNA 3'-end processing that is responsible for lethality in fruit flies.

Pab2 arginine methylation, cellular toxicity, and oculopharyngeal muscular dystrophy.

Our results indicate that the C-terminal arginine-rich domain of Pab2 is methylated via the protein arginine methyltransferase 1 (RMT1). Mammalian PABP2 is also methylated at arginines by PRMT1 and PRMT3 *in vitro* (21). Similarly, we found that the *S. pombe* homologs of human PRMT1 and PRMT3 can methylate fission yeast Pab2 at arginines *in vitro* (data not shown). Yet, our gene deletion studies in yeast clearly indicate that RMT1 is the main enzyme responsible for Pab2 arginine methylation *in vivo* (Fig. 3A). Such a finding is consistent with the nuclear and cytoplasmic localizations of RMT1 and RMT3, respectively (26). We have also analyzed the effect of arginine methylation on the regulation of Pab2 protein interactions. Our data demonstrate that Pab2 self-association is modulated by arginine methylation (Fig. 6). This latter observation suggests a molecular basis for the Pab2-dependent increase in cellular toxicity detected in *rmt1*-null cells (Fig. 7). Indeed, our results support a model in which the kinetics of self-association are favored for the unmethylated form of Pab2, thereby leading to higher levels of toxic Pab2 oligomers in *rmt1*-null cells as compared to wild-type cells.

The extent of PABP2 oligomerization is a key factor associated with the formation of nuclear aggregates that are characteristic of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). Studies using cell culture models indeed correlate PABP2 oligomerization, aggregate formation, and cellular toxicity (20,51,72). Significantly, our data extend these results and describe the importance of arginine methylation in the control of Pab2 oligomerization and cellular toxicity. This finding may offer beneficial therapeutic approaches for OPMD, as the enzymatic activity of PRMTs is likely to be more easily targeted than protein-protein interactions to reduce PABP2 oligomerization. To date, however, the arginine methylation status of PABP2 found in OPMD-related nuclear aggregates has not been investigated.

Increasing the cellular concentration of Pab2 in normal cells also resulted in reduced growth rates (Fig. 7), consistent with studies in which Nab2 (73) and wild-type PABP2 (74,75) were overexpressed. Pab2 dosage may affect poly(A) RNA trafficking and gene expression (20,75), but the exact mechanism of growth defects remains to be determined.

The identification of a nuclear poly(A)-binding protein in fission yeast will provide powerful biochemical and genetic tools to study the mechanism of poly(A) tail length control as well as the various components required for this process. Furthermore, our *S. pombe* model should prove to be extremely useful for better understanding the biological significance of Pab2 methylation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to JF. Jacques and M. Arguin for help with the electrophoretic separation during the poly(A) tail length analyses; S. Labbé and J. Beaudoin for utilization of the fluorescent microscope; Allan Jacobson, Alex Brodsky, Oona Johnstone, M. Bisailon for critical reading of the manuscript. F.B. is a Chercheur-Boursier of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

1. Dreyfus, M., and Regnier, P. (2002) *Cell* **111**(5), 611-613
2. Bird, G., Fong, N., Gatlin, J. C., Farabaugh, S., and Bentley, D. L. (2005) *Mol Cell* **20**(5), 747-758
3. Dower, K., Kuperwasser, N., Merrikh, H., and Rosbash, M. (2004) *Rna* **10**(12), 1888-1899
4. Meaux, S., and Van Hoof, A. (2006) *Rna* **12**(7), 1323-1337
5. Edmonds, M. (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**, 285-389
6. Mangus, D. A., Evans, M. C., and Jacobson, A. (2003) *Genome Biol* **4**(7), 223
7. Proudfoot, N., and O'Sullivan, J. (2002) *Curr Biol* **12**(24), R855-857
8. Wahle, E., and Ruegsegger, U. (1999) *FEMS Microbiol Rev* **23**(3), 277-295
9. Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999) *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2), 405-445
10. Chen, J., and Moore, C. (1992) *Mol Cell Biol* **12**(8), 3470-3481
11. Hector, R. E., Nykamp, K. R., Dheur, S., Anderson, J. T., Non, P. J., Urbinati, C. R., Wilson, S. M., Minvielle-Sebastia, L., and Swanson, M. S. (2002) *Embo J* **21**(7), 1800-1810
12. Minvielle-Sebastia, L., Preker, P. J., Wiederkehr, T., Strahm, Y., and Keller, W. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15), 7897-7902
13. Kühn, U., and Wahle, E. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1678**(2-3), 67-84
14. Wahle, E. (1991) *Cell* **66**(4), 759-768
15. Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S., and Wahle, E. (2003) *J Biol Chem* **278**(19), 16916-16925
16. Wahle, E., Lustig, A., Jenó, P., and Maurer, P. (1993) *J Biol Chem* **268**(4), 2937-2945
17. Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., and Wahle, E. (2003) *Embo J* **22**(14), 3705-3714
18. Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I., and Simonelig, M. (2005) *Dev Cell* **9**(4), 511-522
19. Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chrétien, N., Tomé, F. M., Lafrenière, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A.

- D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codère, F., Fardeau, M., and Rouleau, G. A. (1998) *Nat Genet* **18**(2), 164-167
20. Calado, A., Tomé, F. M., Brais, B., Rouleau, G. A., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000) *Hum Mol Genet* **9**(15), 2321-2328
 21. Smith, J. J., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H. R., and Wahle, E. (1999) *J Biol Chem* **274**(19), 13229-13234
 22. Bedford, M. T., and Richard, S. (2005) *Mol Cell* **18**(3), 263-272
 23. Ong, S. E., Mittler, G., and Mann, M. (2004) *Nat Methods* **1**(2), 119-126
 24. Lee, J., and Bedford, M. T. (2002) *EMBO Rep* **3**(3), 268-273
 25. Boisvert, F. M., Côté, J., Boulanger, M. C., and Richard, S. (2003) *Mol Cell Proteomics* **2**(12), 1319-1330
 26. Bachand, F., and Silver, P. A. (2004) *Embo J* **23**(13), 2641-2650
 27. Blanchet, F., Cardona, A., Letimier, F. A., Hershfield, M. S., and Acuto, O. (2005) *J Exp Med* **202**(3), 371-377
 28. Mowen, K. A., Schurter, B. T., Fathman, J. W., David, M., and Glimcher, L. H. (2004) *Mol Cell* **15**(4), 559-571
 29. Balint, B. L., Szanto, A., Madi, A., Bauer, U. M., Gabor, P., Benko, S., Puskas, L. G., Davies, P. J., and Nagy, L. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(13), 5648-5663
 30. Boisvert, F. M., Déry, U., Masson, J. Y., and Richard, S. (2005a) *Genes Dev* **19**(6), 671-676
 31. Friesen, W. J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss, G. (2001) *Mol Cell* **7**(5), 1111-1117
 32. Côté, J., and Richard, S. (2005) *J Biol Chem* **280**(31), 28476-28483
 33. Côté, J., Boisvert, F. M., Boulanger, M. C., Bedford, M. T., and Richard, S. (2003) *Mol Biol Cell* **14**(1), 274-287
 34. Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X., and Corbett, A. H. (2002) *J Biol Chem* **277**(10), 7752-7760
 35. Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. (2005) *Genes Dev* **19**, 1885-1893
 36. Kwak, Y. T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K. J., Surabhi, R. M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R. B. (2003) *Mol Cell* **11**(4), 1055-1066

37. Boisvert, F. M., Côté, J., Boulanger, M. C., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., and Richard, S. (2002) *J Cell Biol* **159**(6), 957-969
38. Yu, M. C., Bachand, F., McBride, A. E., Komili, S., Casolari, J. M., and Silver, P. A. (2004) *Genes Dev* **18**(16), 2024-2035
39. Swiercz, R., Person, M. D., and Bedford, M. T. (2005) *Biochem J* **386**(Pt 1), 85-91
40. Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J., and Ruley, H. E. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(13), 4859-4869
41. Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M. C., Aldaz, C. M., and Bedford, M. T. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11), 6464-6468
42. Boisvert, F. M., Chénard, C. A., and Richard, S. (2005b) *Sci STKE* **2005**(271), re2
43. Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) *Yeast* **14**(10), 943-951
44. Maundrell, K. (1993) *Gene* **123**(1), 127-130
45. Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M., and Carr, A. M. (1998) *Gene* **221**(1), 59-68
46. Bachand, F., Lackner, D. H., Bähler, J., and Silver, P. A. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(5), 1731-1742
47. Minvielle-Sebastia, L., Winsor, B., Bonneaud, N., and Lacroute, F. (1991) *Mol Cell Biol* **11**(6), 3075-3087
48. Gary, J. D., and Clarke, S. (1998) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**, 65-131
49. Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006) *Nat Biotechnol* **24**(7), 841-847
50. Benoit, B., Nemeth, A., Aulner, N., Kühn, U., Simonelig, M., Wahle, E., and Bourbon, H. M. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**(19), 3771-3778
51. Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2001) *Hum Mol Genet* **10**(21), 2341-2351
52. Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenö, P., Lustig, A., and Wahle, E. (1995) *Nucleic Acids Res* **23**(20), 4034-4041
53. Maundrell, K. (1990) *J Biol Chem* **265**(19), 10857-10864

54. Zhelkovsky, A., Helmling, S., and Moore, C. (1998) *Mol Cell Biol* **18**(10), 5942-5951
55. Brown, C. E., and Sachs, A. B. (1998) *Mol Cell Biol* **18**(11), 6548-6559
56. Mangus, D. A., Evans, M. C., Agrin, N. S., Smith, M., Gongidi, P., and Jacobson, A. (2004) *Mol Cell Biol* **24**(12), 5521-5533
57. Dheur, S., Nykamp, K. R., Viphakone, N., Swanson, M. S., and Minvielle-Sebastia, L. (2005) *J Biol Chem* **280**(26), 24532-24538
58. Brodsky, A. S., and Silver, P. A. (2000) *Rna* **6**(12), 1737-1749
59. Brune, C., Munchel, S. E., Fischer, N., Podtelejnikov, A. V., and Weis, K. (2005) *Rna* **11**(4), 517-531
60. Dunn, E. F., Hammell, C. M., Hodge, C. A., and Cole, C. N. (2005) *Genes Dev* **19**(1), 90-103
61. Hammell, C. M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C. V., Stutz, F., Moore, C., and Cole, C. N. (2002) *Mol Cell Biol* **22**(18), 6441-6457
62. Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T. H. (2001) *Nature* **413**(6855), 538-542
63. Hilleren, P., and Parker, R. (2001) *Rna* **7**(5), 753-764
64. Jensen, T. H., Patricio, K., McCarthy, T., and Rosbash, M. (2001) *Mol Cell* **7**(4), 887-898
65. Wahle, E. (1995) *J Biol Chem* **270**(6), 2800-2808
66. Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993) *Embo J* **12**(2), 585-594
67. Ahn, S. H., Kim, M., and Buratowski, S. (2004) *Mol Cell* **13**(1), 67-76
68. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.

- K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) *Nature* **418**(6896), 387-391
69. Thakurta, A. G., Ho Yoon, J., and Dhar, R. (2002) *Yeast* **19**(9), 803-810
70. Afonina, E., Stauber, R., and Pavlakis, G. N. (1998) *J Biol Chem* **273**(21), 13015-13021
71. Hosoda, N., Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2006) *Mol Cell Biol* **26**(8), 3085-3097
72. Wang, Q., Mosser, D. D., and Bag, J. (2005) *Hum Mol Genet* **14**(23), 3673-3684
73. Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Green, D. M., and Corbett, A. H. (2003) *J Biol Chem* **278**(9), 6731-6740
74. Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006) *Embo J* **25**(10), 2253-2262
75. Corbeil-Girard, L. P., Klein, A. F., Sasseville, A. M., Lavoie, H., Dicaire, M. J., Saint-Denis, A., Page, M., Duranceau, A., Codère, F., Bouchard, J. P., Karpati, G., Rouleau, G. A., Massie, B., Langelier, Y., and Brais, B. (2005) *Neurobiol Dis* **18**(3), 551-567

FOOTNOTES

The abbreviations used are: PABP, poly(A)-binding protein; PAB, poly(A) binding protein; PRMT, protein arginine methyltransferase, RMT, arginine methyltransferase, RRM, RNA recognition motif; OPMD, oculopharyngeal muscular dystrophy; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione-S-transferase; PAP, Poly(A)-polymerase.

CHAPITRE 2**COTRANSCRIPTIONAL RECRUITMENT OF THE NUCLEAR
POLY(A)-BINDING PAB2 TO NASCENT TRANSCRIPTS AND
ASSOCIATION WITH TRANSLATING mRNPS**

Caroline Lemieux et François Bachand

Publié dans

Nucleic Acids Research (2009) 37, 3418-3430

RNA group/Groupe ARN, Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada.

CONTRIBUTION

J'ai contribué activement à l'élaboration du projet et j'ai réalisé toutes les expériences, mis à part la spectrométrie de masse servant à identifier les protéines purifiées avec Pab2. J'ai fait le montage de toutes les figures et j'ai contribué à l'écriture de l'article.

RÉSUMÉ

La polyadénylation des pré-ARNm a des conséquences importantes sur la traduction de l'ARNm au cytosol. Chez la plupart des eucaryotes, il est envisagé que la polyadénylation nucléaire du pré-ARNm exige la *poly(A)-binding protein* (PABPN1/PABP2) pour synthétiser la queue poly(A) tout en contrôlant la taille de celle-ci. Toutefois, l'importance de l'association entre PABPN1 et l'ARNm exporté au cytosol est mal connue. Des essais d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont démontré que l'orthologue de PABPN1 chez la levure à fission *S. pombe* (Pab2) est recruté co-transcriptionnellement aux gènes activement transcrits. De façon surprenante, le recrutement de Pab2 aux gènes précède celui d'un facteur impliqué pour le clivage et la polyadénylation (Pcf1 1), suggérant que Pab2 est recrutée durant l'élongation de la transcription. L'ajout d'une étape d'ARNase aux ChIP et aux essais d'immunoprécipitation suggère que Pab2 est recrutée co-transcriptionnellement via les ribonucléoprotéines associées à l'ARNm naissant (mRNP). De plus, une purification d'affinité de la protéine Pab2 couplée à la spectrométrie de masse a révélé que cette protéine s'associe à plusieurs protéines ribosomales ainsi que des facteurs de traduction générale. Alors que des résultats précédents avaient suggéré que la *poly(A)-binding protein* nucléaire n'était pas associée aux ARNm cytosoliques, nous montrons qu'une portion de la population de Pab2 demeure associée aux ARNm activement traduits. Ainsi, nos résultats suggèrent que Pab2 est recrutée aux mRNPs naissants lors de la transcription tout en restant associé aux mRNPs traduits.

ABSTRACT

Synthesis of the pre-mRNA poly(A) tail in the nucleus has important consequences on the translational activity of the mature mRNA in the cytoplasm. In most eukaryotes, nuclear polyadenylation of pre-mRNAs is thought to require the nuclear poly(A)-binding protein (PABP2/PABPN1) for poly(A) tail synthesis and ultimate length control. As yet, however, the extent of the association between PABP2 and the exported mRNA remains poorly understood. Here we used chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to show that the fission yeast ortholog of mammalian PABP2 (Pab2) is cotranscriptionally recruited to active genes. Notably, the association of Pab2 to genes precedes that of a typical 3' processing/polyadenylation factor, suggesting that Pab2 recruitment during the transcription cycle precedes polyadenylation. The inclusion of an RNase step in our ChIP and immunoprecipitation assays suggests that Pab2 is cotranscriptionally recruited via nascent mRNPs. Tandem affinity purification coupled with mass spectrometry also revealed that Pab2 associates with several ribosomal proteins as well as general translation factors. Importantly, whereas previous results suggest that the nuclear poly(A)-binding protein is not present on cytoplasmic mRNAs, we show that fission yeast Pab2 is associated with polysomes. Our findings suggest that Pab2 is recruited to nascent mRNPs during transcription and remains associated with translated mRNPs after nuclear export.

INTRODUCTION

Two evolutionarily conserved poly(A)-binding proteins (PABPs) have been characterized with some details: PABPC in the cytoplasm and PABP2/PABPN1 in the nucleus (1,2). Consistent with its cytosolic localization, PABPC (Pab1 in yeast) stimulates translation initiation by mediating contacts between the mRNA 5'- and 3'-ends via interactions between PABPC and components of the translational machinery (3,4). PABPC also appears to act as an antagonist of nonsense-mediated decay (5-7), a pathway of mRNA surveillance that targets transcripts with premature termination codons. Studies in budding yeast and mammals indicate that Pab1 and PABPC, respectively, shuttle between the nucleus and cytoplasm (8-10) and that Pab1 facilitates the biogenesis and the export of mRNAs (9-11). Consistent with an evolutionarily conserved nuclear function for the cytosolic PABP, intron-containing RNAs can be copurified with mammalian PABPC (12).

The nuclear counterpart of PABPC, PABP2, is structurally different from PABPC and thought to function during polyadenylation of pre-mRNAs. Polyadenylation of most eukaryotic pre-mRNAs consists of a two-step reaction involving endonucleolytic cleavage and poly(A) tail addition. An exhaustive list of evolutionarily conserved proteins responsible for specific and efficient 3'-end processing have been characterized (13-15). These conserved proteins form large multisubunit complexes that bind different *cis*-acting elements in the 3'-end of pre-mRNAs and determine the site of endonucleolytic cleavage. It has now become clear that 3'-end processing events are tightly integrated to the transcription cycle (reviewed in (13,14,16,17) through the carboxy-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II (Pol II). The Pol II CTD consists of evolutionarily conserved heptad repeats that are thought to act as a platform for the recruitment of various *trans*-acting factors required for pre-mRNA maturation (18). Notably, this includes many factors involved in 3'-end processing/polyadenylation that are recruited late during the transcription cycle and near the polyadenylation site of yeast (19-21) and human (22,23) genes.

Following cleavage, the nuclear poly(A) polymerase is responsible for the synthesis of poly(A) tails with average length of 70 and 300 nucleotides in yeast and mammals, respectively (2,24). Experiments using *in vitro* polyadenylation assays suggest that PABP2 has a dual role in 3'-end formation: (i) PABP2 stimulates processive poly(A) synthesis by direct and simultaneous interactions with the growing poly(A) tail and the poly(A) polymerase (25) and (ii) PABP2 promotes the transition from processive to distributive poly(A) synthesis once a specific length is reached (26). Whereas the genome of the yeast *S. cerevisiae* does not encode for an ortholog of mammalian PABP2, we have recently reported the identification of the PABP2 ortholog in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* (27). Deletion of *S. pombe PAB2* results in the expression of RNAs with hyperadenylated tails, indicating that factors other than Pab2 stimulate poly(A) polymerase processivity. Therefore, the precise role of the nuclear poly(A)-binding protein in pre-mRNA polyadenylation *in vivo* remains unclear.

Translocation of the mRNA ribonucleoprotein (mRNP) complex from the nucleus to the cytoplasm is linked to remodeling events mediated by a myriad of different proteins (28,29). As yet, the status of the association between PABP2 and nascent mRNPs during and after transit from the nuclear pore complex remains poorly understood. Although mammalian PABP2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm (30), earlier results suggest that PABP2 is restricted to nuclear transcripts. Specifically, it has been shown that human PABP2 copurifies with a subunit of the nuclear cap-binding complex, but not with the general translation initiation factor, eIF4E (31). On the basis of these results and the different steady-state distribution of PABPC and PABP2, it has been suggested that poly(A)-bound PABP2 is replaced by PABPC upon transit of the mRNP to the cytosol. The mechanism and cellular compartment of such a substitution between PABP2 and PABPC remain elusive, however.

To further characterize the role of the nuclear poly(A)-binding protein during mRNA synthesis, we performed a comprehensive analysis of Pab2 during mRNP formation in fission yeast. Using chromatin immunoprecipitation assays, our results suggest that Pab2 associates with pre-mRNAs cotranscriptionally prior to 3'-end processing/polyadenylation.

Furthermore, tandem affinity purification and mass spectrometry revealed that Pab2 associates with proteins involved in diverse RNA-related functions, including several proteins involved in cytoplasmic translation. Notably, we show that Pab2 is a shuttling protein and present strong evidence that Pab2 associates with translating mRNPs. Our data suggest that Pab2 is recruited early during the transcription cycle and remains associated with translated mRNPs after nuclear export.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Growth Media and Genetic Methods. The strains used in this study are listed in Table 1. *Schizosaccharomyces pombe* was grown at 30°C in yeast extract medium with amino acid supplements (YES) and Edinburgh minimum medium (EMM) containing appropriate amino acid supplements. *S. pombe* cells were transformed with plasmids and PCR products by the lithium acetate method. The strains expressing TAP-tagged version of Pab2 and Pcf11 were constructed by PCR-based gene targeting as described previously (32,33). The oligonucleotide sequences used for the construction of these strains are available upon request. Appropriate tagging of strain was confirmed by PCR and immunoblotting.

Table 1. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Ref.
FBY13	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1</i>	39
FBY101	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 Pab2-TAP::kanMX6</i>	This study
FBY152	<i>MATa ura3 leu2 lys NUP49::TRP1 (pUN100 nup49-313-LEU2)</i>	40
FBY153	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 Pcf11-TAP::kanMX6</i>	This study
FBY187	<i>h+ ade6M210 leu1-32 ura4Δ18 his3Δ1 PAB2::URA4</i>	This study

Plasmids. Cloning of Pab2 in fusion with the green fluorescent protein (GFP) in a *S. pombe*-based plasmid was previously described (27). To generate a *S. cerevisiae*-based plasmid that expresses GFP-Pab2, the DNA encoding the GFP-Pab2 cassette was amplified by PCR using oligonucleotide sequences containing XhoI and EcoRI restriction sites. The resulting PCR product was then cloned into p416ADH (34) that was previously digested with EcoRI and XhoI restriction enzymes to create plasmid pFB197. The *ADHI* promoter of pFB197 was replaced by the *CYC1* promoter (406 bp) via PCR amplification from *S. cerevisiae* genomic DNA using oligonucleotide sequences containing SacI and SpeI restriction sites. Following digestion of the PCR product, the DNA was cloned into the SacI and SpeI site of pFB197 to create pFB235. The open reading frame encoding for *S. pombe* Pab1 was amplified by PCR from genomic DNA using oligonucleotide sequence containing NotI and BglII restriction sites. Following digestion of the PCR product with

NotI and BglII, the DNA was cloned into the NotI and BglII site of pSLF273 (35) to create plasmid pFB243.

Antibodies. Mouse monoclonal antibody specific to recognize the carboxy-terminal heptapeptide repeat present on the largest subunit of RNA Polymerase II (Rpb1; 8WG16) was from Covance Research Products. Rabbit anti-Protein A was from Sigma. Mouse monoclonal antibody specific to HA (clone 12CA5) was from Roche Applied Science. Rabbit polyclonal antibodies specific to fission yeast 40S ribosomal protein S2 (Rps2) were raised at Covance Research Products against GST fusion proteins purified from *Escherichia coli*.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. ChIP assays were performed as previously described (36). For RNA Polymerase II ChIPs, a mouse monoclonal antibody specific for the C-terminal domain of Pol II (8WG16) was used. For the analysis of the *NMT1* gene, thiamine was added to the culture medium at a final concentration of 30 μ M for 3 hours. Determination of RNA-dependent ChIP signals was based on a previously described procedure (37). Briefly, the crosslinking time was reduced to 5 min and the lysis buffer was adjusted to a final SDS concentration of 0.05%. Chromatin preparation were then treated or not treated with a cocktail of RNases to obtain 7.5 U of RNase A and 300 U of RNase T1. Subsequent steps were as previously described (36).

Quantification of the immunoprecipitated DNA was done by quantitative real-time PCR (Rotor-gene 3000, Corbett life sciences) using gene-specific primer sets. Specific dilutions of coimmunoprecipitated DNA as well as of sonicated and reverse cross-linked input DNA were used to determine the percentage of input DNA in each immunoprecipitate. To calculate the increase in signal for the different gene regions, the percentage input values obtained by quantitative PCR were normalized to the percentage input value obtained with the nontranscribed intergenic region, arbitrarily set to 1. The 104-bp PCR amplicon corresponding to the intergenic region lies on the left arm of chromosome I (nucleotides 3009380 to 3009484). Each PCR was run in triplicate, and all

chromatin immunoprecipitations were repeated at least three times using independent chromatin extracts.

Protein purification. Coimmunoprecipitation assays of RNA Pol II were based on a previously described procedure (38). Briefly, cells were grown in YES at 30°C to mid-log phase and lysed in ice-cold lysis buffer (25 mM NaPO₄ at pH 6.8, 0.1 M KOAc, 2 mM MgOAc, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 3 ng/mL pepstatin, 3 ng/mL leupeptin, 3ng/mL aprotinin, 3 ng/mL chymostatin, 0.2 mM Na₃VO₄, 5 mM β-glycerophosphate, 1 mM NaF) with a Fastprep FP120 using 0.5 mm glass beads. The protein concentration of lysates was determined by the Bradford protein assay. Lysates were precleaned overnight at 4°C with Glutathione-Sepharose beads that had been previously pre-equilibrated in lysis buffer. The lysate was transferred to IgG-Sepharose beads that had been previously pre-equilibrated in IP buffer (Lysis buffer with 0.5 mM NH₄OAc and 0.1% Tween 20) for 4 hours at 4°C. The beads were then washed five times with 1 mL IP buffer, and the bound proteins eluted by incubating for 5 min at 95°C in 1X SDS-PAGE sample buffer. For coimmunoprecipitation with RNase treatment, the IgG-Sepharose beads were washed four times and incubated for 30 min at room temperature with 7.5 U of RNase A and 300 U of RNase T1. After the RNase treatment, the beads were washed two times and the bound proteins were eluded with 1X SDS-PAGE at 95°C for 5 min. Samples were subjected to a 7% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose in 10mM CAPS (pH 11) and 1% MeOH. Following incubation with specific primary antibodies, membranes were probed with goat anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies conjugated to IRdye 800 (LI-COR Odyssey) and Alexa fluor 680 (Invitrogen), respectively. Linear detection of the proteins was performed and quantified using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR).

Purification of the carboxy-terminal TAP-tagged Pab2 was performed as previously described (39) from 8 L of fission yeast cells. Mass spectrometry analyses were done at the Southern Alberta Mass Spectrometry (SAMS) Centre for Proteomics (University of Calgary).

Nuclear export assays. Nuclear export assays in *S. cerevisiae* were done as previously described (40) with some modifications. Briefly, GFP-Pab2 (pFB235), NLS-LacZ-GFP (pFB145) and Nab2-GFP (pFB147) expression constructs were transformed into *S. cerevisiae* strain FBY152 that harbors the *nup49-313* temperature-sensitive allele. Cells were grown to OD₆₀₀ 0.1 at 25°C in SC medium and separated into two different cultures that were grown for 5 h at the permissive (25°C) or nonpermissive (37°C) temperature. To prevent the synthesis of new GFP-tagged proteins in the cytoplasm, cycloheximide (100 µg/mL) was added to each sample for the last hour to inhibit translation. Cells were examined for GFP fluorescence signal by live fluorescence.

Polysome assay. Polysome profiles were generated from *S. pombe* as previously described (39). To disrupt ribosomes by chelating Mg²⁺ ions, EDTA was added to final concentration of 20 mM to the lysis buffer. The lysate was loaded onto 5-45% (w/w) sucrose gradient containing 20 mM EDTA. For RNase disruption of polysomes, the lysate was incubated with 22 U/mL RNase A for 10 min at room temperature before ultracentrifugation onto 5-45% (w/w) sucrose gradients. KCl treatment of extracts was performed by the addition of salt to a final concentration of 500 mM in polysome lysis buffer and the sucrose gradient. Analysis of formaldehyde crosslinked ribosome profiles was done as previously described (41). Briefly, shaved ice and formaldehyde were added to cultures at final concentrations of 25% and 1%, respectively. After gentle mixing, cells were left on ice for 15 minutes and 0.1 M glycine was added to stop the crosslinking reaction. Cell lysis and ultracentrifugation were as previously described (39) except that KCl was adjusted to 500 mM in lysis buffer and sucrose gradients. For puromycin treatment experiments, a mixture of 1 mM puromycin/2 mM GTP was added to the culture for 15 minutes at 30°C before cell lysis. Lysis buffer was also adjusted to 1 mM puromycin/2 mM GTP. Sucrose gradients were fractionated by upward displacement with 55% (w/w) sucrose using a gradient fractionator (Brandel Inc.) connected to a UA-6 UV monitor (Teledyne Isco) for continuous measurement of the absorbance at 254 nm. 20 fractions of 600 µl were collected and the proteins were TCA-precipitated. Proteins from same amounts of each fraction were separated onto 12% SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting.

RESULTS

Cotranscriptional recruitment of Pab2 to active genes precedes 3'-end processing/polyadenylation signals.

Electron microscopy has previously detected PABP2 in the vicinity of transcription complexes using salivary glands from the insect *Chironomus tentans* (42). To investigate further the mechanism by which the nuclear poly(A)-binding protein associates with the transcriptional machinery, we used chromatin immunoprecipitations (ChIP) to examine whether *S. pombe* Pab2 is recruited during the transcription cycle of RNA polymerase II (Pol II). ChIP assays have been used extensively to determine the position of mRNA processing factors along genes and infer the steps at which they are recruited during the transcription cycle. Three Pol II-transcribed genes (*ADHI*, *PYK1*, and *PGK1*) were first examined because of their relatively strong transcription levels (43). To perform ChIP assays, we used a strain in which a Pab2-TAP fusion protein was expressed from the endogenous *PAB2* promoter. The Pab2-TAP strain did not confer cold sensitivity in contrast to *PAB2*-null cells (27) and showed doubling times similar to a wild-type control (data not shown), suggesting that TAP-tagged Pab2 is functional. The amount of genomic DNA associated with a TAP-tagged version of Pab2 was determined by real-time PCR using primer sets located at the 5'-end, the middle, and the 3'-end of the *ADHI*, *PYK1*, and *PGK1* genes (Fig. 1A).

ChIP experiments using antibodies specific for the large subunit of RNA Pol II (Rpb1) demonstrated similar crosslinking levels across the *ADHI* coding region (Fig. 1B). In contrast, ChIP assays using extracts of cells that expressed a TAP-tagged version of the cleavage/polyadenylation factor Pcf11 showed robust crosslinking near the polyadenylation site of the *ADHI* gene (Fig. 1C). The ChIP patterns for fission yeast Rpb1 and Pcf11 are consistent with similar analyses reported in the budding yeast *S. cerevisiae* (20,37,44) and demonstrate the validity of our ChIP assays. Pab2 associated mainly with the middle and the 3'-end of the *ADHI*, *PYK1*, and *PGK1* genes, although some levels of crosslinking were also detected at the 5'-end of these genes (Fig. 1D). To confirm and better visualize the gradient of association of Pab2 from 5' to 3', we used the 2.3-kb-long *MET26* gene (Fig. 1A). *MET26* was chosen because the larger size of this gene allows for a better

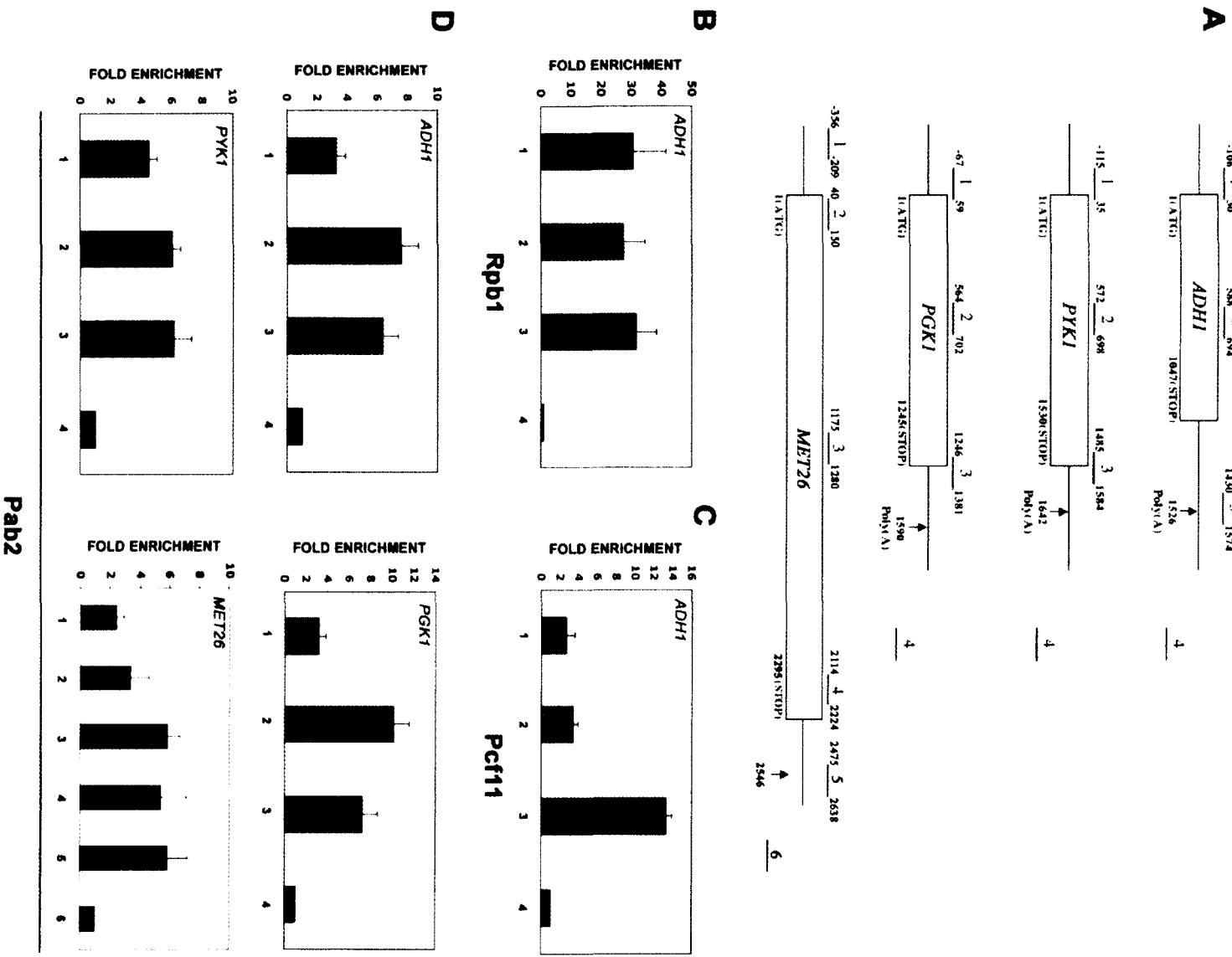


Figure 1

Figure 1. Association of Pab2 to active genes precedes that of the characterized 3'-processing factor, Pcf11.

(A) Schematic diagram of genes used for ChIP assays. Boxes represent open reading frames and nucleotides numbers are relative to the initiation codon. Arrows indicate the position of the predicted polyadenylation site based on the 3'UTR sequences of the *ADHI*, *PYK1*, *PGK1*, and *MET26* genes (74). Bars above each gene show the position of PCR products used for analyses in the ChIP assays. The number above each bar is used for identification in subsequent figures. PCR product number 4 (*ADHI*, *PYK1* and *PGK1*) and number 6 (*MET26*) corresponds to the nontranscribed intergenic region (see Materials and Methods) and served as the internal background control. Crosslinked and sonicated extracts from wild-type cells (B) as well as from cells that express Pcf11-TAP (C) and Pab2-TAP (D) were subjected to affinity purification using IgG-sepharose (C and D) or antibodies specific for the large subunit of RNA Pol II (Rpb1) (B). The coprecipitating DNA was amplified by real-time PCR using gene-specific primer pairs as indicated in A. The abundance of the different gene segments from *ADHI* (B, C, and D) as well as from the *PYK1*, *PGK1*, and *MET26* genes (D) in each immunoprecipitate was expressed as fold enrichment relative to the nontranscribed intergenic region value, arbitrarily set to 1. The values correspond to the means of at least three independent experiments.

resolution of gene segments. Consistent with the data obtained for the *ADH1*, *PYK1*, and *PGK1* genes, the enrichment of Pab2 at the 5'-end of the *MET26* gene (Fig. 1D, regions 1 and 2) clearly increased in the middle and at the 3'-end. Further analysis of Pab2 crosslinking using intron-containing genes demonstrated ChIP profiles similar to intronless genes (Fig. 2). The results of these ChIP experiments using six different genes indicate a general 5' to 3' enrichment of Pab2.

To determine whether the association of Pab2 to Pol II-specific genes is dependent on active transcription, real-time PCR was performed on Pab2-enriched genomic DNA using primer sets spanning the *NMT1* coding region (Fig. 3A). Expression of the *S. pombe* *NMT1* gene is strongly repressed following addition of thiamine (45). As can be seen in Fig. 3B, Pab2 immunoprecipitates prepared from extracts of cells that were previously grown in the absence of thiamine (active conditions) showed a ChIP pattern on the *NMT1* gene consistent with the crosslinking profiles detected for the *ADH1*, *PYK1*, *PGK1*, and *MET26* genes. In contrast, the levels of Pab2 crosslinking across the *NMT1* gene were similar to the intergenic control region after repression of the *NMT1* promoter (with thiamine). These results indicate that recruitment of Pab2 to genes requires active transcription by RNA Pol II.

Pab2 interacts with the nascent mRNP in the vicinity of the transcription complex.

The requirement for active transcription to detect Pab2 crosslinking along the coding region of the *NMT1* gene suggested that Pab2 might physically interact with components of the transcriptional machinery. We therefore affinity purified TAP-tagged Pab2 from cell extracts using IgG-sepharose and analyzed the precipitated proteins by immunoblotting. Consistent with a previous study in which the coimmunoprecipitation of PABP2 and RNA Pol II from insect cells was demonstrated (42), our experiments also indicated that the large subunit of yeast RNA Pol II (Rpb1) copurifies with TAP-tagged Pab2, but not with a control purification (data not shown). Importantly, we further examined whether the association between Pab2 and the transcriptional machinery is mediated by the nascent mRNP. To test this possibility, extracts were treated with a cocktail of RNases before ChIP

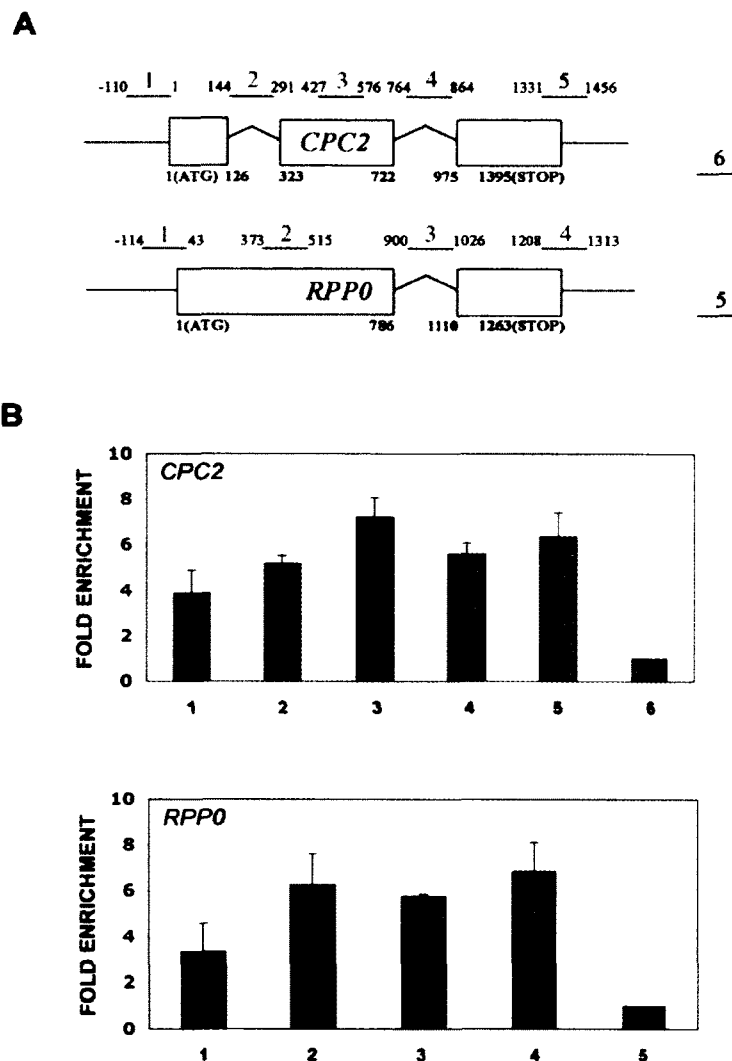


Figure 2. Association of Pab2 to intron-containing genes.

(A) Schematic diagram of genes used for ChIP assays. Boxes represent exons and nucleotides numbers are relative to the initiation codon. The number above each bar is used for identification in B. PCR product number 6 (*CPC2*) and number 5 (*RPP0*) corresponds to the nontranscribed intergenic region and served as the internal background control. (B) ChIPs were performed on cells that express TAP-tagged Pab2 using methods similar to those described in Figures 1.

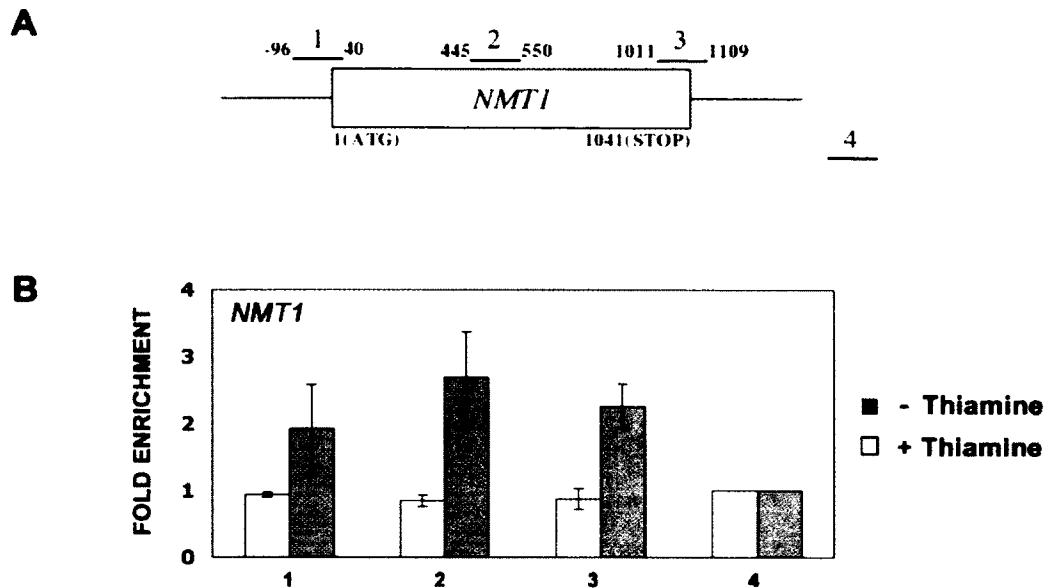


Figure 3. Transcription-dependent recruitment of Pab2 to the *NMT1* gene.

(A) The schematic diagram shows the positions of the PCR products used to analyze the *NMT1* gene in the ChIP assays. (B) ChIP assays were performed on cells that express TAP-tagged Pab2 and that were treated (white bars) or not treated (gray bars) with 30 μ M thiamine for 3 hours. The coprecipitating DNA was amplified by real-time PCR using gene-specific primer pairs as indicated in (A). The abundance of the different *NMT1* gene segments in each immunoprecipitate was expressed as fold enrichment relative to the nontranscribed intergenic region value, arbitrarily set to 1. The values correspond to the means of at least three independent experiments.

analysis. Whereas the ChIP signals for RNA Pol II were not perturbed upon RNase treatment, the level of Pab2 crosslinking over the entire *ADHI* coding region was reduced after the samples were treated with RNases (Fig. 4A). These results indicate that the nascent transcript is important for the association between Pab2 and genomic DNA in the ChIP assays. Furthermore, the level of Rpb1 that copurified with Pab2-TAP was reduced after RNase treatment (Fig. 4B, lanes 2-3), consistent with the importance of RNA for the association between Pab2 and the transcription machinery. Taken together, these immunoprecipitation experiments suggest that recruitment of Pab2 to transcribed genes is mediated by nascent mRNPs.

Pab2 associates with cellular components involved in diverse RNA-related functions.

To date, the protein interaction network of the nuclear poly(A)-binding protein remains largely unknown. To get further insights into the mechanism by which Pab2 is cotranscriptionally recruited to nascent mRNPs, a tandem affinity purification approach was used to identify proteins that associate with fission yeast Pab2. Extracts were prepared from 8 L of cells that expressed a TAP-tagged version of Pab2 as well as from untagged control cells. Following two rounds of purification over IgG-sepharose and calmodulin-bound resins, the eluted proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. As can be seen in Fig. 5A, all of the associated proteins were in substoichiometric amounts relative to Pab2. Analysis of the eluted proteins by mass spectrometry identified unique peptides that corresponded to gene products that are involved in a wide range of RNA-related functions (Fig. 5B and Table 2). Notably, peptides from 32 ribosomal proteins, 4 general translation factors, as well as from the cytosolic poly(A)-binding protein (Pab1) were identified (Table 2 and Fig. 5B). Peptides that correspond to the evolutionarily conserved nuclear poly(A) polymerase were also detected (Fig. 5B), consistent with the role of Pab2 in polyadenylation (27). Other proteins identified that participate in RNA metabolism included the RNA helicase Mtr4, the 5'-to-3' exonuclease Exo2, the mRNA decapping subunit Dcp2, and the nuclear cap-binding protein Cbp80 (Fig. 5B). Protein factors for which the *S. cerevisiae* orthologs are functionally implicated in mRNA export were also coprecipitated with Pab2; these included the orthologs of the *S. cerevisiae* proteins Thp1, Mtr10, and Mtr2. Consistent with the aforementioned results (Fig. 4),

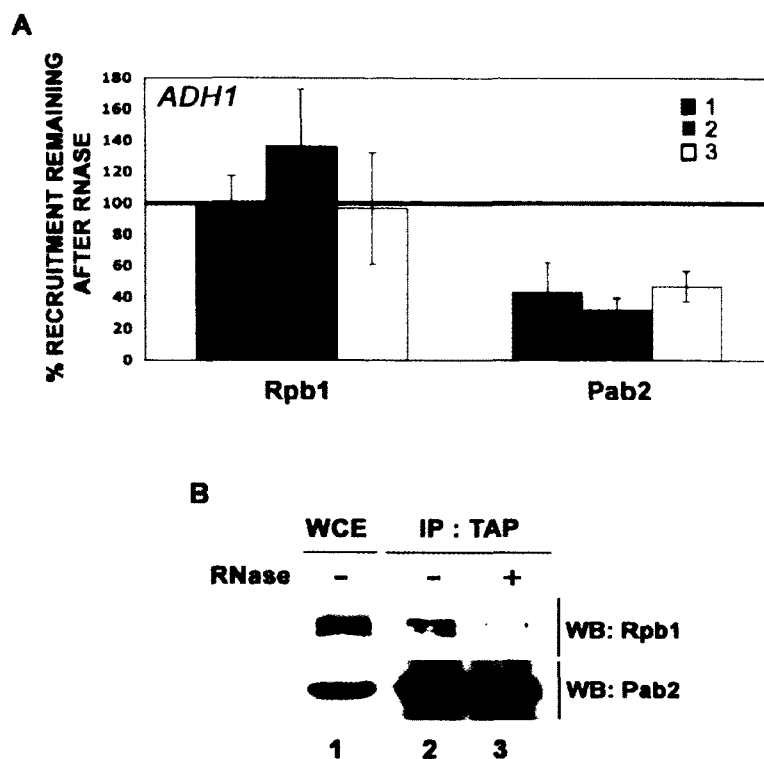


Figure 4. Pab2 interacts with the nascent mRNP in the vicinity of the transcription complex.

(A) Rpb1 and Pab2-TAP ChIPs with and without an RNase treatment step were performed using wild-type cells (for Rpb1) as well as using cells that express TAP-tagged Pab2 using methods similar to those described in Figure 1. The coprecipitating DNA was quantified by real-time PCR using *ADHI*-specific primer pairs as shown in Figure 1. The percentage signal remaining after RNase treatment was calculated as the ratio of the fold enrichment for the RNase-treated sample over the fold enrichment of the sample not treated with RNases. Values correspond to the means of at least three independent experiments. (B) Equal amounts of a whole cell extract (*WCE*, lane 1) prepared from Pab2-TAP cells were subjected to affinity purification using IgG-sepharose (lanes 2 and 3). The amount of extract loaded in lane 1 represents 2% of the protein used in the immunoprecipitation. Following extensive washing steps, the beads were treated (lane 3) or not treated (lane 2) with RNases. The eluted proteins were analyzed by Western blotting (*WB*) using antibodies specific to Rpb1 (*upper panel*) and to the TAP epitope (*lower panel*).

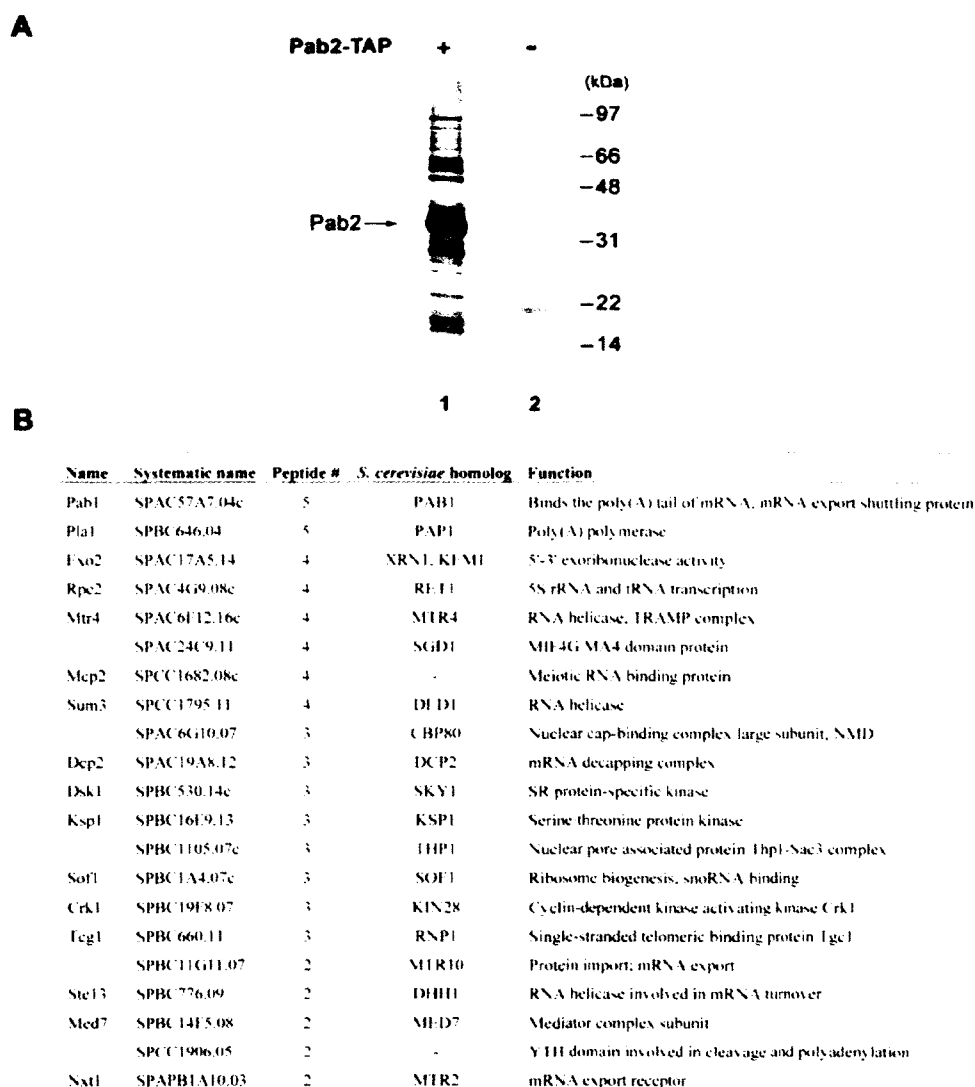


Figure 5. Purification of proteins associated with TAP-tagged Pab2.

(A) Proteins copurified with Pab2 by tandem affinity purification (lane 1) were resolved using a Bis-Tris 4–12% gradient SDS–PAGE and analyzed by silver staining. The result for an identically treated extract from control *S. pombe* is shown in lane 2. Molecular weight markers are shown on the right in kilodaltons (kDa). The position of Pab2 is indicated on the left. (B) Summary of the nonribosomal proteins identified by mass spectrometry from the Pab2-TAP purification.

Table 2. Ribosomal proteins and translation factors identified in the Pab2-TAP purification

Name	Systematic ame	Function
Ribosomal proteins		
Rps2	SPCC576.08c	40S ribosomal subunit S2
Rps7	SPAC18G6.14c	40S ribosomal subunit S7
Rps801	SPAC2C4.16c	40S ribosomal subunit S8
Rps802	SPAC521.05	40S ribosomal subunit S8
Rps901	SPAC24H6.07	40S ribosomal subunit S9
Rps902	SPBC29A3.12	40S ribosomal subunit S9
Rps1101	SPAC31G5.03	40S ribosomal subunit S11
Rps13	SPAC6F6.07c	40S ribosomal subunit S13
Rps1501	SPCC1393.03	40S ribosomal subunit S15
Rps2202	SPAC5D6.01	40S ribosomal subunit S15a
Rps3002	SPBC19G7.03c	40S ribosomal subunit S30
Rpl401	SPBC1711.06	60S ribosomal subunit L2
Rpl402	SPBP8B7.03c	60S ribosomal subunit L2
Rpl301	SPAC17A5.03	60S ribosomal subunit L3
Rpl302	SPAPB8E5.06c	60S ribosomal subunit L3
Rpl6	SPCC622.18	60S ribosomal subunit L6
Rpl701	SPBC18H10.12c	60S ribosomal subunit L7
Rpl8	SPBC29A3.04	60S ribosomal subunit L7a (L8)
Rpl1101	SPAC26A3.07c	60S ribosomal subunit L11
Rpl1201	SPCC16C4.13c	60S ribosomal subunit L12A
Rpl13	SPAC664.05	60S ribosomal subunit L13
Rpl1801	SPBC11C11.07	60S ribosomal subunit L18
Rpl2001	SPAC3A12.10	60S ribosomal subunit L20a
Rpl2101	SPBC365.03c	60S ribosomal subunit L21
Rpl2102	SPAC959.08	60S ribosomal subunit L21
Rpl2501	SPBC106.18	60S ribosomal subunit L25
Rpl2802	SPCC5E4.07	60S ribosomal subunit L27a.2/L28A
Rpl29	SPBC776.01	60S ribosomal subunit L29
Rpl3001	SPAC9G1.03c	60S ribosomal subunit L30
Rpl31	SPAC890.08	60S ribosomal subunit L31
Rpl3601	SPCC970.05	60S ribosomal subunit L36
Rpl3602	SPBC405.07	60S ribosomal subunit L36
Translation factors		
Efla-a	SPCC794.09c	Translation elongation factor
Moel	SPAC637.07	Translation initiation factor eIF3d
Sup35	SPCC584.04	Translation release factor class II
Tif1	SPBC25H2.07	Translation initiation factor eIF1A

RNA could be responsible for the copurification of some of these proteins. Importantly, with the exception of one ribosomal protein for which some peptides were detected in the control purification, no peptides were detected in the control for any of the proteins indicated in Fig. 5B and Table 2. In conclusion, our proteomic analysis suggests that Pab2 is associated with factors involved in several steps of the mRNA life cycle.

Pab2 is a shuttling protein that associates with translating mRNPs.

Fission yeast and human nuclear poly(A)-binding proteins are predominantly nuclear at steady state (27,46). Yet, PABP2 was detected in the cytoplasm of human cells by electron microscopy (46) and has been shown to shuttle between the nucleus and cytoplasm (30). To test the capacity of fission yeast Pab2 to shuttle, we used a *NUP49*-based assay in *S. cerevisiae* (47) as such an *in vivo* export assay does not exist in *S. pombe*. The *nup49-313* allele of *S. cerevisiae* expresses a temperature-sensitive nucleoporin that exhibits defective nuclear import at the nonpermissive temperature without perturbing export of protein and RNA from the nucleus (48). Accordingly, the *nup49-313* allele has been used to assay the export of several nuclear RNA-binding proteins (40,47,49).

Consistent with previous reports indicating that *S. cerevisiae* Nab2 is a shuttling protein (40,50), cytoplasmic accumulation of Nab2 was observed at the nonpermissive temperature (Fig. 6, panels G and H), whereas Nab2 was predominantly nuclear at the permissive temperature (panels E and F). The expression of GFP-tagged Pab2 in *S. cerevisiae* resulted in nuclear localization (Fig. 6, panels I and J), consistent with the steady state localization of Pab2 in fission yeast (27). In contrast, significant GFP signal was detected in the cytoplasm of Pab2-expressing cells that were shifted to the nonpermissive temperature (panels K and L). As a control, a GFP-tagged LacZ protein that includes a strong nuclear localization signal remained in the nucleus at both permissive and nonpermissive temperatures (Fig. 6, panels A to D). This control also demonstrated that the cycloheximide treatment before imaging prevented *de novo* synthesis of GFP-tagged proteins in the cytoplasm. The results of the nuclear export assay indicate that Pab2 can shuttle between the nucleus and the cytoplasm.

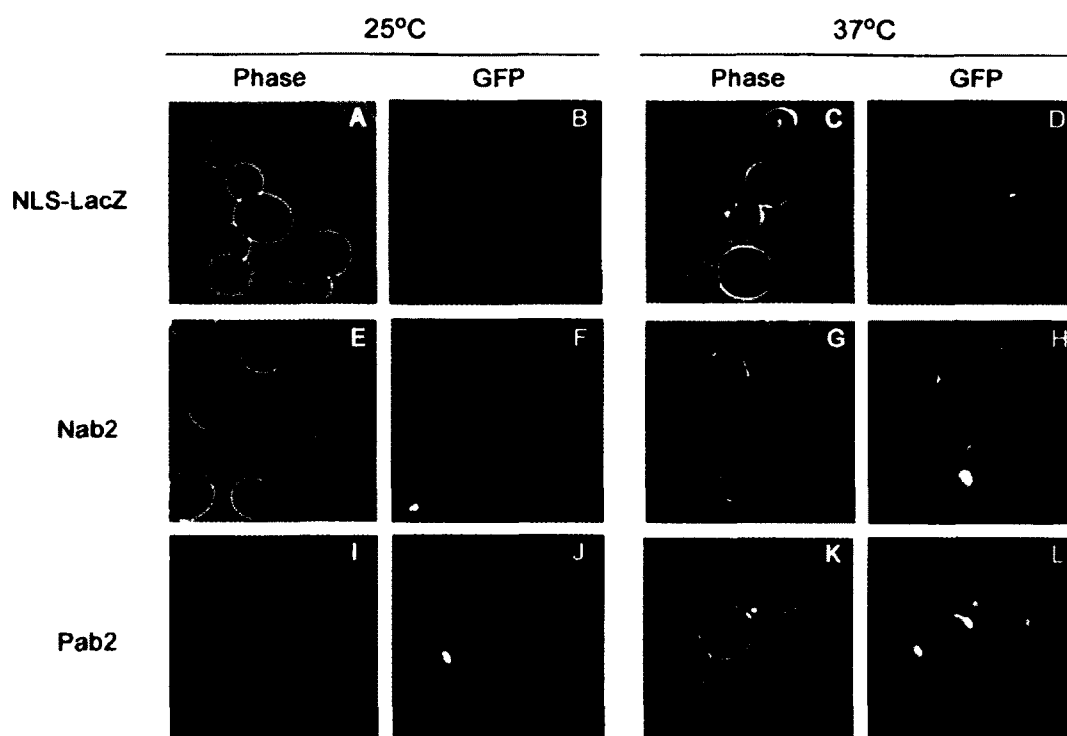


Figure 6. Pab2 shuttles between the nucleus and cytoplasm.

The nuclear export assay was performed using *S. cerevisiae* cells that express the *nup49-313* allele as described in the Materials and Methods. *nup49-313* cells expressing either NLS-LacZ-GFP (panels A-D), Nab2-GFP (panels E-H), and GFP-Pab2 (panels I-L) were incubated at 25°C (panels A, B, E, F, I, J) or shifted to 37°C (panels C, D, G, H, K, L) before treatment with cycloheximide to block new protein synthesis. Phase contrast (panels A, C, E, G, I, K) and GFP fluorescence (panels B, D, F, H, J, L) are shown.

The aforementioned results indicating that Pab2 is a shuttling protein suggested that the detection of ribosomal proteins and translation factors in the eluate of the Pab2-TAP purification could be the result of the association between Pab2 and translating mRNPs. We therefore tested whether Pab2 cosedimented with polysomal mRNAs by examining the fractionation profile of Pab2 after ultracentrifugation using sucrose gradients. As can be seen on Fig. 7A, Western blot analysis indicated that significant amounts of Pab2 were detected in ribosome-containing fractions (lanes 6-19). We also determined the ratio of

ribosome-associated proteins for Pab2, Pab1, and a protein of the small ribosomal subunit, Rps2 (Fig. 7A). Roughly 36% of cellular Pab1 cosedimented with ribosomes, consistent with earlier studies (51-53). Notably, our sucrose gradient fractionation experiments indicated that 25% of cellular Pab2 was ribosome-associated (Fig. 7A). As expected for a ribosomal protein, most of Rps2 was associated with ribosome-containing fractions (lanes 6-19) and free ribosomal subunits (lanes 3-5). These results indicate that Pab2 cosediments with polysomes.

To validate that the sedimentation behavior of Pab2 reflects an association with polysomes, ribosomes were first disrupted into ribosomal subunits by chelating Mg^{2+} ions. As can be seen in Fig. 7B, Pab2 was no longer detected in the heavy fractions of the gradient under these conditions, suggesting that the sedimentation of Pab2 in heavy fractions requires the presence of polysomes. Treating cellular extracts with RNase A prior to ultracentrifugation also perturbed the normal distribution of Pab2 after velocity sedimentation on sucrose gradients (Fig. 7C). Specifically, RNase treatment resulted in the disruption of polysomal complexes and the concomitant redistribution of Pab2 to lighter fractions. These results are consistent with the association of Pab2 with translating mRNPs.

To confirm that Pab2 associates with polysomes and not with other large RNPs, we used the translation inhibitor, puromycin. Puromycin specifically disrupts polysomes by causing premature release of nascent peptides as well as of mRNAs from ribosomes (54). Accordingly, treatment of cells with puromycin resulted in the almost complete disappearance of polysomes and the concurrent accumulation of 80S monosomes (Fig. 7D). Importantly, Pab1, Pab2, and Rps2 were removed from polysomes-containing fractions after puromycin treatment (Fig. 7D). These results demonstrate that Pab2 is specifically associated with polysomal mRNPs.

Given that Pab2 shows nuclear localization at steady state (Fig. 6; (27)), it was important to determine whether the association of Pab2 with polysomes occurs *in vivo*. To test this, cells were crosslinked with formaldehyde prior to lysis, extracts were prepared

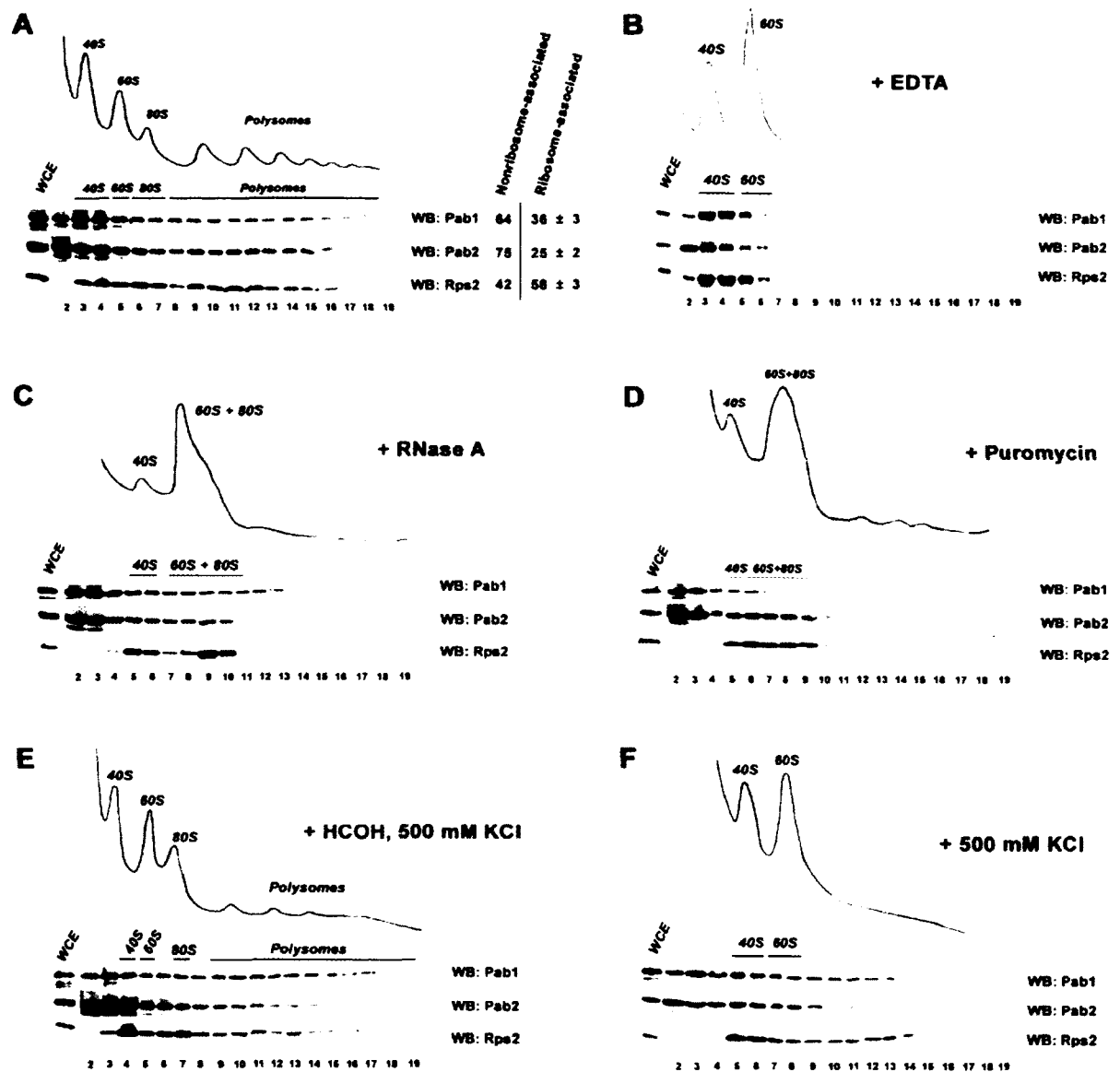


Figure 7. Pab2 associates with translating mRNPs.

(A to F, *top panels*) Ribosomal profiles from *S. pombe* were determined by continuous measurement of rRNAs at 254 nm. (A to F, *bottom panels*) Pab1, Pab2, and Rps2 were visualized by Western blotting using anti-HA, anti-protein A, and anti-Rps2, respectively. (A) Sedimentation profile of extracts from Pab2-TAP cells on sucrose gradients. Quantification of the amount of Pab1, Pab2, and Rps2 in nonribosomal fractions (*lanes 2-5*) and in ribosomal fractions (*lanes 6-19*) is shown on the right. Values correspond to the

means of at least three independent experiments. (B) Sedimentation profile of EDTA-treated extracts from Pab2-TAP cells on sucrose gradients. (C) Sedimentation profile of RNase-treated extracts from Pab2-TAP cells on sucrose gradients. (D) Sedimentation profile of extracts from puromycin-treated Pab2-TAP cells on sucrose gradients. (E) Sedimentation profile of salt-treated extracts from Pab2-TAP cells that were previously treated with formaldehyde. (F) Sedimentation profile of salt-treated extracts from Pab2-TAP cells on sucrose gradients.

using high-salt conditions, and separated on sucrose gradients. As can be seen on Fig. 7E, a significant amount of Pab2 cosedimented with polysomes under these experimental conditions. Conversely, Pab2 was redistributed to lighter fractions under similar high-salt conditions, but lacking the formaldehyde crosslinking step (Fig. 7F). These experiments indicate that the high-salt conditions dissociated proteins that had not been crosslinked to the mRNPs before cell lysis, including Pab2. Our data thus indicate that a fraction of Pab2 is associated to polysomes *in vivo*.

DISCUSSION

Although experiments using purified versions of the nuclear poly(A)-binding proteins (PABP2) have provided insights into its biochemical properties, the functions as well as the network of associations of PABP2 in a cellular context remain poorly understood. We have recently reported the identification of the ortholog of the mammalian nuclear poly(A)-binding protein in *S. pombe* (27). Consistent with a functional role in poly(A) tail synthesis, RNAs from *PAB2*-null cells display hyperadenylated 3'-ends (27). In this study, we investigated the recruitment of Pab2 during mRNA ribonucleoprotein (mRNP) formation and the subsequent association between Pab2 and exported mRNPs. Based on our results, we propose that Pab2 is recruited early during the transcription cycle of RNA Pol II genes and remains associated with translating mRNPs after nuclear export. These findings provide novel insights into the events that govern mRNP remodeling as it transits to the cytoplasm.

During eukaryotic transcription, nascent pre-mRNAs are wrapped in ribonucleoprotein complexes that contain factors required for processing and export (55). It is now established that most factors required for processing and export of pre-mRNAs are loaded onto the nascent mRNP as it comes out of the polymerase RNA exit channel. The cotranscriptional loading of RNA processing factors includes several cleavage/polyadenylation factors that show recruitment near the 3'-end of genes as determined by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays (19-23). The ChIP assays presented in this study indicated that Pab2 is cotranscriptionally recruited to Pol II-specific genes. Given the function of Pab2 in polyadenylation control (27), we propose that the recruitment of Pab2 during transcription is important to increase the local concentration of Pab2 onto the nascent mRNP until the synthesis of a nascent poly(A) tail by the poly(A) polymerase. Pre-mRNA polyadenylation would then provide high-affinity binding sites and favor the rapid transfer of Pab2 to the growing poly(A) tail where it would function in poly(A) tail length control.

Pab2 was found to crosslink to the entire coding region of several Pol II genes. Interestingly, Pab2 showed greater enrichment at the 3'-end as compared to the 5'-end of genes (Fig. 1D). The simplest explanation for the increase association of Pab2 during transcription elongation is that Pab2 is recruited by or rapidly transferred to the nascent mRNP. This interpretation is consistent with the sensitivity of Pab2 ChIP and immunoprecipitation assays to RNase, suggesting that Pab2 is cotranscriptionally recruited via the nascent mRNP. The physical fragmentation of RNA during the sonication step is likely to be the cause for the plateau in ChIP signal detected for Pab2 beyond the middle of the *ADH1*, *PYK1*, *PGK1*, and *MET26* genes, and reflects the size of chromatin fragments to <500 bp. Interestingly, our ChIP assays indicated that Pab2 occupancies upstream of the polyadenylation site are sensitive to RNases (Fig. 4). These results could imply that the recruitment of Pab2 is mediated by direct binding to non-poly(A) sequences in the pre-mRNA prior to polyadenylation. We do not favor this interpretation, however, as studies using nuclear poly(A)-binding proteins from various organisms indicate poor binding to nonpolyadenylated RNA as compared to poly(A) (27,56,57). Analogous to our ChIP experiments, sensitivity of ChIP signals to RNases was previously reported for the budding yeast proteins Sub2 and Gbp2 (37,58). In this case, results suggest that the TREX complex mediates the cotranscriptional recruitment of Sub2 and Gbp2 to nascent mRNPs. Similarly, we predict a model in which Pab2 is recruited to the nascent mRNP via protein interactions. A structure-function analysis of *S. pombe* Pab2 should provide useful insights into the mechanism that mediates the cotranscriptional recruitment of Pab2 to nascent mRNPs.

The Pab2 ChIP results described herein are in agreement with earlier electron microscopy studies that have found PABP2 in the vicinity of RNA Pol II along the entire Balbiani ring gene of *Chironomus tentans* (42). This previous study was limited to a single gene, however, and did not address how PABP2 is recruited during the transcription cycle of RNA polymerase II. Our study goes beyond these previous findings and provides evidence for the transcription-dependent recruitment of Pab2 to the *NMT1* gene and to the coding sequences of several other yeast genes that are transcribed constitutively. Furthermore, the inclusion of an RNase step in our experiments supports the recruitment and/or the rapid transfer of Pab2 to the nascent mRNP. It remains unclear, however,

whether RNA-independent interactions exist between Pab2 and the transcription machinery. Whereas the level of *ADHI* mRNA was reduced after RNase-treatment as compared to a non-treated sample, segments of the *ADHI* transcript could still be detected by RT-PCR following treatment with RNases (data not shown). It is therefore likely that the remaining signal detected by our immunoprecipitation assays (Fig. 4) is due to the incomplete digestion of RNA.

Similar to the ChIP profile of Pab2, other cleavage/polyadenylation factors have also been shown to crosslink at promoters and coding regions in yeast and other eukaryotes (19,22,59,60). Although the functional significance for the recruitment of cleavage/polyadenylation factors during the early phase of the transcription cycle remains unclear, the multi-functional nature of some mRNA processing factors might explain this apparent discrepancy. Interestingly, cellular depletion of *Drosophila PABP2* using RNAi results in nuclear accumulation of polyadenylated RNAs (61), suggesting a role for the nuclear poly(A)-binding protein in mRNA export pathways. Studies also indicate that a number of proteins important for efficient mRNA export are recruited during the transcription cycle in budding yeast (37,44,62,63) and humans (64,65). Remarkably, the ChIP profile of many mRNA export factors shows enrichment from the 5'-end to the 3'-end, similar to that of Pab2. Whereas these aforementioned evidence may support a role for the nuclear poly(A)-binding protein in mRNA export, it cannot be excluded that the accumulation of poly(A) RNA in PABP2-depleted *Drosophila* cells is due to defective polyadenylation. Accordingly, evidence in budding yeast indicate that mRNAs that are not properly polyadenylated are retained in the nucleus (66). Further studies are thus needed to establish whether the nuclear poly(A)-binding protein is directly involved in mRNA export.

Pab2 is not restricted to a pioneer round of translation.

mRNP composition changes as it is transferred to the cytoplasm (55). Yet, the molecular details of mRNP remodeling during or after passage through the nuclear pore complex are poorly understood. Based on the different subcellular distribution of PABPC and PABP2 at steady state, cytosolic and nuclear, respectively, it has been proposed that PABPC substitutes for PABP2 after nuclear export of mRNPs. How poly(A)-bound PABP2

is replaced by PABPC during or after nuclear export has remained elusive, however. Importantly, we show here that a significant fraction of Pab2 does not get replaced by Pab1 and remains associated with translating mRNPs. This conclusion is supported by the specific cosedimentation of Pab2 with polyribosomes (Fig. 7) as well as the copurification of ribosomal proteins and translation factors with Pab2 (Fig. 5 and Table 2). Our studies thus provide the first evidence suggesting the association of the nuclear poly(A)-binding protein with translating mRNPs. The presence of peptides corresponding to Pab1 in the eluate of the Pab2-TAP purification (Fig. 5) also suggests that both poly(A)-binding proteins can co-exist on the same poly(A) tail, in agreement with other studies (67,68).

The association of Pab2 with translating mRNPs is in contrast to previous results that suggest that mammalian PABP2 is not associated with general translation. More precisely, biochemical experiments in human cells have suggested that human PABP2 is restricted to a pioneer round of translation (31). In mammalian cells, it has been proposed that aberrant mRNAs containing nonsense codons are recognized during a pioneer round of translation that is defined by mRNAs bound by the nuclear cap-binding complex proteins, Cbp20 and Cbp80 (31,68). The detection of Pab2 in large polysomal fractions reported here (Fig. 7) suggests that Pab2 is not restricted to pioneer rounds of translation, but also associates with actively translated mRNAs. It is therefore possible that the nuclear poly(A)-binding protein performs a slightly different role in mRNA translation between yeast and humans or that technical issues hampered the detection between human PABP2 and translating mRNPs. Our results do not exclude a role for Pab2 in a pioneer round of translation, however. The proteomic analysis of Pab2-associated proteins identified the fission yeast homolog of mammalian Cbp80 (Fig. 5), a key constituent of the pioneer round of translation (31,68). Furthermore, two key factors involved in 5'-to-3' decay of NMD targets, Dcp2 and Exo2, also copurified with Pab2.

The functional significance of the association between Pab2 and translating mRNPs still remains to be determined. Yet, the hypersensitivity of *PAB2*-null cells to different translational inhibitors (C.L. and F.B., unpublished data) is consistent with a possible role for Pab2 in translation. Accordingly, a number of predominantly nuclear proteins have

recently been shown to cosediment with polysomes and modulate translation in yeast and mammals (53,69-73). Conversely, studies indicate that budding yeast Pab1 (homolog of mammalian PABPC) is a shuttling protein that is important for the proper assembly of mRNPs in the nucleus (9,10). Our findings that Pab2 is associated with translating mRNPs are in concert with the conclusions of the aforementioned studies and illustrate the integrated connections between different steps of mRNP formation in the nucleus and the fate of the mature mRNA in the cytoplasm. Future studies on Pab2 will certainly provide insight into the mechanisms that coordinate nuclear polyadenylation and translation in the cytoplasm.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Anita Corbett for *S. cerevisiae* strains and plasmids for the nuclear export assay; members of the Bachand lab for critical reading of the manuscript. This work was supported by a research grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). F.B. is the recipient of a New Investigator Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

REFERENCES

1. Kühn, U. and Wahle, E. (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1678**, 67-84.
2. Mangus, D.A., Evans, M.C. and Jacobson, A. (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, **4**, 223.
3. Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, D.A. and Jacobson, A. (2008) Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature*, **453**, 1276-1280.
4. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. and Sachs, A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, **2**, 135-140.
5. Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S. and Jacobson, A. (2004) A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, **432**, 112-118.
6. Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V. and Izaurralde, E. (2007) A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J*, **26**, 1591-1601.
7. Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z. and Muhlemann, O. (2008) Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol*, **6**, e92.
8. Afonina, E., Stauber, R. and Pavlakis, G.N. (1998) The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*, **273**, 13015-13021.
9. Brune, C., Munchel, S.E., Fischer, N., Podtelejnikov, A.V. and Weis, K. (2005) Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *Rna*, **11**, 517-531.
10. Dunn, E.F., Hammell, C.M., Hodge, C.A. and Cole, C.N. (2005) Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev*, **19**, 90-103.

11. Chekanova, J.A. and Belostotsky, D.A. (2003) Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *Rna*, **9**, 1476-1490.
12. Hosoda, N., Lejeune, F. and Maquat, L.E. (2006) Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. *Mol Cell Biol*, **26**, 3085-3097.
13. Buratowski, S. (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 257-261.
14. Proudfoot, N. and O'Sullivan, J. (2002) Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr Biol*, **12**, R855-857.
15. Rosonina, E., Kaneko, S. and Manley, J.L. (2006) Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev*, **20**, 1050-1056.
16. Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev*, **14**, 1415-1429.
17. Moore, M.J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, **309**, 1514-1518.
18. Phatnani, H.P. and Greenleaf, A.L. (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev*, **20**, 2922-2936.
19. Ahn, S.H., Kim, M. and Buratowski, S. (2004) Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell*, **13**, 67-76.
20. Kim, M., Ahn, S.H., Krogan, N.J., Greenblatt, J.F. and Buratowski, S. (2004) Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *Embo J*, **23**, 354-364.
21. Runner, V.M., Podolny, V. and Buratowski, S. (2008) The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol*, **28**, 1883-1891.
22. Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J. and Bentley, D.L. (2008) RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 71-78.

23. Swinburne, I.A., Meyer, C.A., Liu, X.S., Silver, P.A. and Brodsky, A.S. (2006) Genomic localization of RNA binding proteins reveals links between pre-mRNA processing and transcription. *Genome Res*, **16**, 912-921.
24. Edmonds, M. (2002) A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **71**, 285-389.
25. Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E. and Wahle, E. (2003) Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *Embo J*, **22**, 3705-3714.
26. Wahle, E. (1995) Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem*, **270**, 2800-2808.
27. Perreault, A., Lemieux, C. and Bachand, F. (2007) Regulation of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Arginine Methylation in Fission Yeast. *J Biol Chem*, **282**, 7552-7562.
28. Cole, C.N. and Scarcelli, J.J. (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 299-306.
29. Stewart, M. (2007) Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol Cell*, **25**, 327-330.
30. Calado, A., Kutay, U., Kühn, U., Wahle, E. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *Rna*, **6**, 245-256.
31. Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, L.E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, **106**, 607-617.
32. Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
33. Tasto, J.J., Carnahan, R.H., McDonald, W.H. and Gould, K.L. (2001) Vectors and gene targeting modules for tandem affinity purification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **18**, 657-662.

34. Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122.
35. Forsburg, S.L. (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2955-2956.
36. Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M. and Silver, P.A. (2004) Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev*, **18**, 2024-2035.
37. Abruzzi, K.C., Lacadie, S. and Rosbash, M. (2004) Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *Embo J*, **23**, 2620-2631.
38. Lei, E.P., Krebber, H. and Silver, P.A. (2001) Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev*, **15**, 1771-1782.
39. Bachand, F. and Silver, P.A. (2004) PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *Embo J*, **23**, 2641-2650.
40. Green, D.M., Marfatia, K.A., Crafton, E.B., Zhang, X., Cheng, X. and Corbett, A.H. (2002) Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem*, **277**, 7752-7760.
41. Nielsen, K.H., Szamecz, B., Valasek, L., Jivotovskaya, A., Shin, B.S. and Hinnebusch, A.G. (2004) Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *Embo J*, **23**, 1166-1177.
42. Bear, D.G., Fomproix, N., Soop, T., Bjorkroth, B., Masich, S. and Daneholt, B. (2003) Nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 is associated with RNA polymerase II during transcription and accompanies the released transcript to the nuclear pore. *Exp Cell Res*, **286**, 332-344.
43. Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T. and Bähler, J. (2007) A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol Cell*, **26**, 145-155.

44. Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, J.C. and Stutz, F. (2002) Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol*, **22**, 8241-8253.
45. Maundrell, K. (1990) *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem*, **265**, 10857-10864.
46. Krause, S., Fakan, S., Weis, K. and Wahle, E. (1994) Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp Cell Res*, **214**, 75-82.
47. Lee, M.S., Henry, M. and Silver, P.A. (1996) A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev*, **10**, 1233-1246.
48. Doye, V., Wepf, R. and Hurt, E.C. (1994) A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly(A)⁺ RNA transport and nuclear pore distribution. *Embo J*, **13**, 6062-6075.
49. Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A. and Lee, M.S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*, **12**, 679-691.
50. Duncan, K., Umen, J.G. and Guthrie, C. (2000) A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr Biol*, **10**, 687-696.
51. Anderson, J.T., Paddy, M.R. and Swanson, M.S. (1993) PUB1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 6102-6113.
52. Mangus, D.A., Amrani, N. and Jacobson, A. (1998) Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol Cell Biol*, **18**, 7383-7396.
53. Windgassen, M., Sturm, D., Cajigas, I.J., Gonzalez, C.I., Seedorf, M., Bastians, H. and Krebber, H. (2004) Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Mol Cell Biol*, **24**, 10479-10491.

54. Azzam, M.E. and Algranati, I.D. (1973) Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 3866-3869.
55. Daneholt, B. (2001) Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7012-7017.
56. Benoit, B., Nemeth, A., Aulner, N., Kühn, U., Simonelig, M., Wahle, E. and Bourbon, H.M. (1999) The *Drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *Drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3771-3778.
57. Wahle, E., Lustig, A., Jenö, P. and Maurer, P. (1993) Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem*, **268**, 2937-2945.
58. Hurt, E., Luo, M.J., Rother, S., Reed, R. and Strasser, K. (2004) Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1858-1862.
59. Calvo, O. and Manley, J.L. (2005) The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *Embo J*, **24**, 1009-1020.
60. Komarnitsky, P., Cho, E.J. and Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*, **14**, 2452-2460.
61. Farny, N.G., Hurt, J.A. and Silver, P.A. (2008) Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. *Genes Dev*, **22**, 66-78.
62. Lei, E.P. and Silver, P.A. (2002) Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev*, **16**, 2761-2766.
63. Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R. *et al.* (2002) TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304-308.
64. Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A. and Reed, R. (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, **127**, 1389-1400.

65. Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N. and Reed, R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev*, **19**, 1512-1517.
66. Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. and Jensen, T.H. (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature*, **413**, 538-542.
67. Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I. and Simonelig, M. (2005) An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell*, **9**, 511-522.
68. Chiu, S.Y., Lejeune, F., Ranganathan, A.C. and Maquat, L.E. (2004) The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev*, **18**, 745-754.
69. Bolger, T.A., Folkmann, A.W., Tran, E.J. and Wente, S.R. (2008) The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation. *Cell*, **134**, 624-633.
70. Gross, T., Siepmann, A., Sturm, D., Windgassen, M., Scarcelli, J.J., Seedorf, M., Cole, C.N. and Krebber, H. (2007) The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination. *Science*, **315**, 646-649.
71. Michlewski, G., Sanford, J.R. and Caceres, J.F. (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell*, **30**, 179-189.
72. Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K. and Caceres, J.F. (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev*, **18**, 755-768.
73. Sato, H., Hosoda, N. and Maquat, L.E. (2008) Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell*, **29**, 255-262.
74. Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J. and Bähler, J. (2008) Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, **453**, 1239-1243.

CHAPITRE 3**A pre-mRNA DEGRADATION PATHWAY THAT SELECTIVELY
TARGETS INTRON-CONTAINING GENES REQUIRES
THE NUCLEAR POLY(A)-BINDING PROTEIN**

Caroline Lemieux¹, Samuel Marguerat², Jennifer Lafontaine¹, Nicolas Barbezier¹, Jürg
Bähler², and Francois Bachand¹

Publié dans

Molecular Cell (2011) 44, 108-119

¹RNA group/Groupe ARN, Département de Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada.

²Department of Genetics, Evolution & Environment and UCL Cancer Institute, University College London, U.K.

CONTRIBUTION

J'ai contribué activement à l'élaboration du projet et j'ai réalisé la majorité des expériences, mis à part le Northern Blot spécifique aux déadénylases, la figure 3E, l'analyse du *RNA-Seq* et le clonage du plasmide permettant la surexpression de Rpl30-1. J'ai fait le montage de toutes les figures et j'ai contribué à l'écriture de l'article.

RÉSUMÉ

Les voies générales de dégradation permettent d'éliminer les pré-ARNm irréguliers et non-maturés afin de contrôler la qualité de l'expression génique. Contrairement à ce mécanisme de dégradation générale, nous décrivons ici une voie de dégradation nucléaire des pré-ARNm qui permet de contrôler l'expression de certains gènes ayant des introns. Chez la levure à fission, nous démontrons que la *nuclear poly(A)-binding protein* Pab2 et Rrp6, une composante de l'exosome nucléaire, sont les principaux facteurs impliqués dans une voie de dégradation des pré-ARNm dépendant de la polyadénylation. L'analyse du transcriptome par *RNA-seq* et les expériences où les introns ont été interchangés révèlent que l'épissage inefficace est important pour dicter la susceptibilité de Pab2 à dégrader ces pré-ARNm. De plus, nous avons identifié un mécanisme de régulation entre les paralogues des protéines ribosomales qui est impliqué dans cette voie de dégradation des pré-ARNm. Nos résultats dévoilent que l'expression génique de certains gènes est régulée au niveau du pré-ARNm par l'exosome nucléaire.

ABSTRACT

General discard pathways eliminate unprocessed and irregular pre-mRNAs to control the quality of gene expression. In contrast to such general pre-mRNA decay, we describe here a nuclear pre-mRNA degradation pathway that controls the expression of select intron-containing genes. We show that the fission yeast nuclear poly(A)-binding protein, Pab2, and the nuclear exosome subunit, Rrp6, are the main factors involved in this polyadenylation-dependent pre-mRNA degradation pathway. Transcriptome analysis and intron swapping experiments revealed that inefficient splicing is important to dictate susceptibility to Pab2-dependent pre-mRNA decay. We also show that negative splicing regulation can promote the poor splicing efficiency required for this pre-mRNA decay pathway, and in doing so identify a mechanism of cross-regulation between paralogous ribosomal proteins through nuclear pre-mRNA decay. Our findings unveil a layer of regulation in the nucleus in which the turnover of specific pre-mRNAs, besides the turnover of mature mRNAs, is used to control gene expression.

INTRODUCTION

In eukaryotes, the expression of a protein-coding gene follows an ordered series of events before the mature mRNA exits the nucleus for translation. In the nucleus, the primary transcript (pre-mRNA) is processed 5' to 3' via capping, splicing, cleavage, and polyadenylation. This latter step is generally thought to positively contribute to gene expression by facilitating export and translation. Yet, there is now strong evidence that polyadenylation can also represent a path to RNA destruction in eukaryotes.

Degradative polyadenylation in eukaryotes has been mainly associated with the activity of a multi-protein complex called TRAMP, for Trf4/Trf5-Air1/Air2-Mtr4 polyadenylation complex (LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers et al., 2005). Trf4 and Trf5 are noncanonical poly(A)-polymerases of the TRAMP complex that add short poly(A) to a specific subset of nuclear RNAs. Although the functional role of the TRAMP complex has been studied mostly in *S. cerevisiae*, TRAMP-dependent polyadenylation has been demonstrated in humans, plants, and fission yeast (Chekanova et al., 2007; Shcherbik et al., 2010; Win et al., 2006). Polyadenylation by the TRAMP complex triggers RNA degradation by the nuclear exosome complex (LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005; Wyers et al., 2005). The exosome consist of ten conserved subunits that are thought to organize into a barrel-like configuration (Bonneau et al., 2009). This ten-subunit complex, often referred to as the core exosome, contains a single catalytically active component, Dis3/Rrp44, that displays both exo- and endo-nuclease activities (Dziembowski et al., 2007; Lebreton et al., 2008; Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009). Intriguingly, an additional 3'→5' exonuclease, Rrp6, specifically associates with the core exosome in the nucleus (Allmang et al., 1999b). Interestingly, Dis3 and Rrp6 show different activities in terms of RNA hydrolysis *in vitro* (Liu et al., 2006), perform distinct roles in RNA processing *in vivo* (Allmang et al., 1999a; Callahan and Butler, 2008; Lemay et al., 2010; van Hoof et al., 2000), and are encoded by essential and nonessential genes, respectively. This genetic and biochemical evidence suggest that Dis3 and Rrp6 are likely to have different cellular activities.

Polyadenylation-mediated exosome degradation via the TRAMP complex has been largely associated with nuclear RNA surveillance. Accordingly, it is now believed that gene expression is error-prone and that mistakes are common during transcription and RNA processing (Fasken and Corbett, 2009; Moore and Proudfoot, 2009). Consistently, inactivation of the TRAMP/exosome system leads to the accumulation of aberrantly processed pre-mRNAs (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Torchet et al., 2002), unprocessed rRNAs (Allmang et al., 1999a; Dez et al., 2006), and unmodified tRNAs (Vanacova et al., 2005). Despite the established role of the TRAMP complex in degradative polyadenylation, evidence suggest that the nuclear exosome can also target transcripts polyadenylated by the canonical poly(A) polymerase (Grzechnik and Kufel, 2008; Milligan et al., 2005; van Hoof et al., 2000). Yet, how the exosome selectively targets RNAs polyadenylated by the canonical polyadenylation machinery remains unclear. One possible mechanism by which this might occur could be through the action of poly(A)-binding proteins (PABPs). Accordingly, the fission yeast nuclear PABP, Pab2, has recently been shown to be involved in exosome-dependent RNA processing (Lemay et al., 2010; St-Andre et al., 2010; Yamanaka et al., 2010). Pab2 is the fission yeast homolog of human PABPN1. Notably, mutations in the *PABPN1* gene results in oculopharyngeal muscular dystrophy (Brais et al., 1998), a late onset myopathy for which the molecular basis remains unknown.

Here we report the identification of a pathway that requires Pab2 and the nuclear exosome to target specific unspliced pre-mRNAs for nuclear degradation. Transcriptome analysis by next-generation sequencing identified several dozen genes targeted by Pab2-dependent pre-mRNA decay. By studying how pre-mRNA decay controls the expression of the ribosomal protein gene, *rpl30-2*, we found a cross-regulatory mechanism in which Rpl30-1 inhibits *rpl30-2* splicing to sensitize the unspliced polyadenylated *rpl30-2* pre-mRNA to Pab2/Rrp6-mediated decay. Our findings have identified a mode of gene regulation in which the control of RNA splicing influences the equilibrium between processing and nuclear decay of specific pre-mRNAs.

RESULTS

Pab2 controls *rpl30-2* expression at the level of the pre-mRNA.

We previously used DNA microarrays to investigate for gene expression changes in cells lacking the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 (Lemay et al., 2010). Although the expression levels of most protein-coding genes were unaffected in the *pab2Δ* strain, RNA level expressed from the ribosomal protein-coding gene, *rpl30-2*, was increased by 4.5-fold in the absence of Pab2 (Lemay et al., 2010). To independently validate this result, we compared *rpl30-2* mRNA levels between wild-type and *pab2Δ* strains by Northern analysis and confirmed a 3-fold increase of *rpl30-2* mRNA in *pab2*-null cells (Fig. 1A, lanes 1-2). Interestingly, a slower-migrating transcript also accumulated in the *pab2Δ* strain (lane 2). Because the coding sequence of *rpl30-2* is interrupted by a 246-nt intron, we tested whether the larger transcript corresponded to the *rpl30-2* pre-mRNA. The use of an intron-specific probe confirmed that the slower-migrating *rpl30-2* transcript is the unspliced pre-mRNA (Fig. 1A, lane 4). The increased level of *rpl30-2* pre-mRNA in the absence of Pab2 resulted in a 3-fold increase in the percentage of unspliced transcripts (Fig. S5A). This alteration in the unspliced ratio of *rpl30-2* in the *pab2Δ* strain makes it unlikely that this result is due to increased transcription. Accordingly, ChIP experiments demonstrated similar RNA Pol II densities along the *rpl30-2* gene in both wild-type and *pab2Δ* strains (Fig. S1B). We also confirmed that the absence of Pab2 did not affect the cleavage and polyadenylation steps of *rpl30-2* by RNase H experiments (Fig. S1C). Interestingly, regulation of *rpl30-2* by Pab2 was specific to one of the two *rpl30* paralogs, as the expression of *rpl30-1* was unchanged in *pab2Δ* cells (Fig. 1A). In conclusion, both the mRNA and the pre-mRNA of *rpl30-2* are upregulated in the absence of Pab2.

We next addressed whether synthesis of the pre-mRNA was required for Pab2-dependent control of *rpl30-2* mRNA level. We therefore generated an intronless construct (RPL30-2Δi) that expressed the *rpl30-2* cDNA from native promoter and terminator sequences. As a control, we prepared a similar construct, but using the intron-containing version of *rpl30-2*. These two constructs were chromosomally-integrated as a single copy into a *rpl30-2Δ* strain. We then deleted *pab2* from *rpl30-2Δ* strains that expressed intronless

Figure 1

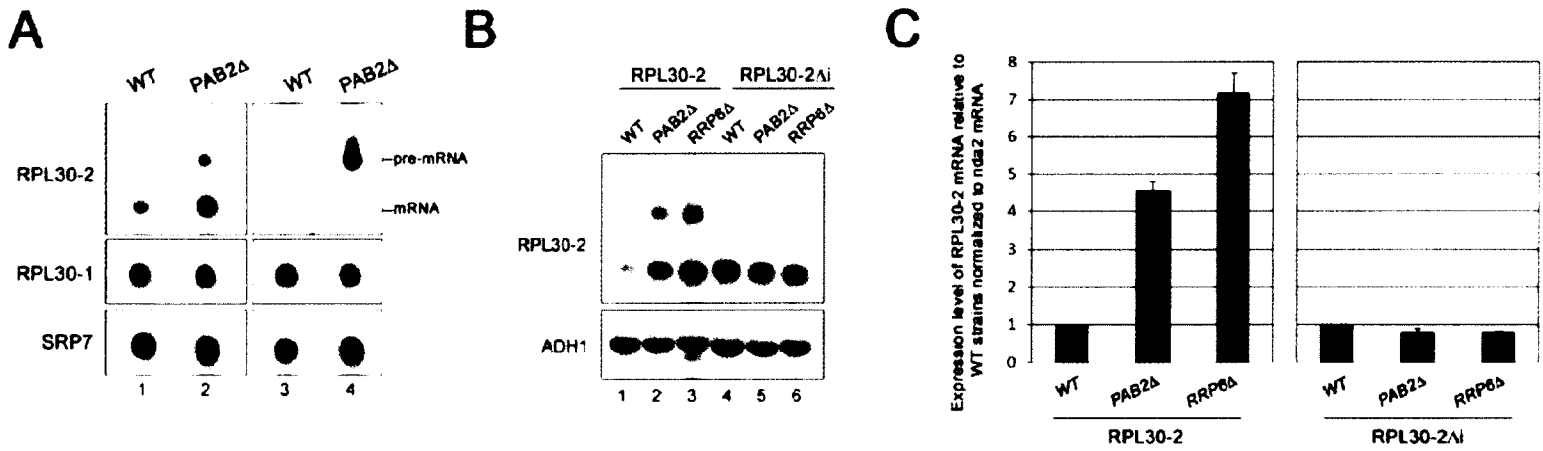


Figure 1. Pab2 regulates the expression of *rpl30-2* at the level of the pre-mRNA.

(A) Northern blot analysis of RNA from wild-type (lanes 1 and 3) and *pab2Δ* (lanes 2 and 4) strains. The blot was hybridized using a DNA probe complementary to *rpl30-2* exon 1 (lanes 1-2) and intron (lanes 3-4) sequences. The blot was also probed for *rpl30-1* and *srp7* transcripts. (B) Northern blot analysis of RNA from wild-type (lanes 1 and 4), *pab2Δ* (lanes 2 and 5), and *rrp6Δ* (lanes 3 and 6) strains that express *rpl30-2* from intron-containing (lanes 1-3) and intronless (RPL30-2Δi; lanes 4-6) constructs. (C) Quantitative PCR analysis of *rpl30-2* mRNA level in the same strains described in (B) using a primer pair in which one primer spans the exon-exon junction. The data and error bars represent the average and standard deviation from three independent experiments. See also Figure S1.

and intron-containing versions of *rpl30-2*. Similar to endogenous *rpl30-2*, expression from the *rpl30-2* intron-containing construct in the *pab2Δ* strain resulted in the accumulation of mRNA and pre-mRNA (Fig. 1B, lanes 1-2; Fig. 1C). Interestingly, the intronless *rpl30-2* construct resulted in increased levels of mRNA relative to the intron-containing construct (Fig. 1B, lanes 1 and 4); yet, mRNA levels were not increased in the *pab2Δ* strain when *rpl30-2* was expressed from the intronless construct (Fig. 1B, lanes 4-5; Fig. 1C). These results indicate that Pab2 controls *rpl30-2* expression at the level of the unspliced pre-mRNA.

Pab2 and the nuclear exosome control *rpl30-2* expression by pre-mRNA decay.

The increased levels of both spliced and unspliced *rpl30-2* transcripts in the *pab2Δ* strain make it unlikely that Pab2 is required for *rpl30-2* splicing. Consistent with this, inhibition of splicing using fission yeast *prp2-1* and *prp10-1* mutant strains (Urushiyama et al., 1997) resulted in a marked reduction of spliced *rpl30-2* mRNA (data not shown). We therefore reasoned that Pab2 might target the *rpl30-2* pre-mRNA for degradation. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) has previously been shown to target unspliced pre-mRNAs for degradation (Sayani et al., 2008). Our results, however, indicated that Pab2 regulates *rpl30-2* expression by a mechanism independent of NMD (Fig. S2).

The physical and functional interactions between Pab2 and the nuclear exosome required for snoRNA processing (Lemay et al., 2010) led us to examine whether the exosome functions with Pab2 in the regulation of *rpl30-2* expression. We examined the level of *rpl30-2* pre-mRNA and mRNA in *dis3-54* and *rrp6Δ* strains, which are mutated in two 3'→5' exonucleases specific to the exosome. Northern blot analysis of RNA prepared from the *rrp6Δ* strain revealed robust upregulation of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA: 5- and 18-fold, respectively (Fig. 2A, lane 7; Fig. 2B-2C); whereas *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA were upregulated 1.5- and 3.5-fold, respectively, using RNA from the *dis3* mutant (Fig. 2A, lane 5; Fig. 2B-2C). Interestingly, the levels of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA were higher in the *pab2Δ dis3-54* double mutant strain compared to the single *dis3-54* mutant (Fig. 2A; compare lanes 5-6; Fig. 2B-2C). In contrast, no cumulative increase in the levels of *rpl30-2* transcripts were observed in the *pab2Δ rrp6Δ* double mutant strain relative to the single *rrp6Δ* strain (Fig. 2A; lanes 7-8; Fig. 2B-2C). These data suggest that Pab2 and Rrp6 control *rpl30-2* expression through a common degradation pathway, whereas Pab2 and Dis3 appear to function via distinct pathways. The control of *rpl30-2* expression by Pab2 and the exosome appears to be primarily mediated in the nucleus, as the deletion of *ski7*, which encodes a cytosolic-specific exosome cofactor, did not perturb *rpl30-2* expression (Fig. 2A, lane 9; Fig. 2B-2C).

The TRAMP polyadenylation complex enhances the activity of the nuclear exosome (Callahan and Butler, 2010; LaCava et al., 2005; Vanacova et al., 2005). We therefore examined whether TRAMP-dependent polyadenylation was required for the regulation of *rpl30-2* expression by deleting the gene that encodes the single catalytic subunit of fission yeast TRAMP, *cid14* (Win et al., 2006). Analysis of RNA from *cid14Δ* cells showed normal levels of *rpl30-2* pre-mRNA and mRNA (Fig. 2A, lane 3; Fig. 2B-2C). However, the deletion of *cid14* in the *pab2Δ* strain increased the levels of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA compared to the single *pab2Δ* strain (Fig. 2A, compare lanes 2 and 4). Similar results were obtained using a conditional strain in which the genomic copy of *mtr4* is expressed from the thiamine-sensitive *nmt1⁺* promoter: depletion of Mtr4 did not affect *rpl30-2* pre-mRNA and mRNA levels (Fig. 2D, compare lanes 3 and 7); however, depletion

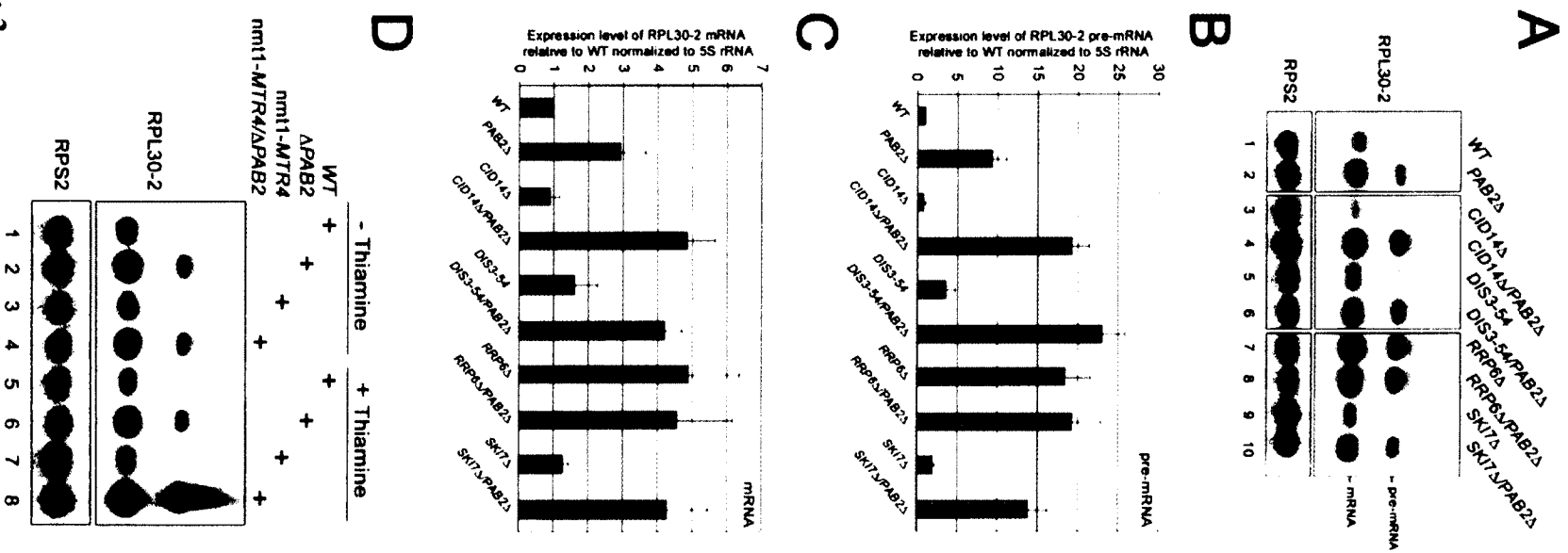


Figure 2

Figure 2. Pab2 and the nuclear exosome control *rpl30-2* expression.

(A) Northern blot analysis of RNA from the indicated strains. Quantification of Northern blot data for *rpl30-2* pre-mRNA (B) and mRNA (C) levels. The data and error bars represent the average and standard deviation from at least three independent experiments. (D) The indicated strains were grown to mid-log phase before being treated (lanes 5–8) or not (lanes 1–4) with thiamine to repress the *nmt1* promoter. Equal amounts of RNA were analyzed by Northern blot. See also Figure S2.

of Mtr4 in the *pab2Δ* strain increased the levels of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA compared to the single *pab2Δ* strain (Fig. 2D, compare lanes 4 and 8).

Altogether, these data suggest that Pab2 and Rrp6 play a central role in the control of *rpl30-2* expression at the level of pre-mRNA turnover. Consistent with this, *rpl30-2* expression levels were unaffected in the *rrp6Δ* strain when *rpl30-2* was expressed from the intronless construct (Fig. 1B, lanes 4 and 6), similar to results using the *pab2Δ* mutant (Fig. 1B, lane 5). Interestingly, the control of *rpl30-2* expression by pre-mRNA decay appears largely independent of the TRAMP complex, as cells deficient for two independent TRAMP-associated proteins, Cid14 and Mtr4, showed normal *rpl30-2* expression.

Pab2/Rrp6-mediated degradation of *rpl30-2* pre-mRNA is polyadenylation dependent.

Gene regulation by a nuclear PABP at the level of pre-mRNA decay predicts a polyadenylation-dependent mechanism. To address whether a 3' poly(A) tail is required for the control of *rpl30-2* expression by Pab2 and Rrp6, a *rpl30-2* construct was made in which a variant of the hepatitis Delta ribozyme (Bird et al., 2005) was inserted upstream of the *rpl30-2* polyadenylation site (Fig. 3A). Although cleavage by the hepatitis Delta ribozyme will generate a 5' product ending with a 2',3'-cyclic phosphate, it has been shown that transcripts with such a 3' end can be degraded by the exosome in budding yeast (Meaux and Van Hoof, 2006). The *rpl30-2* ribozyme and wild-type constructs were chromosomally-integrated as a single copy into a *rpl30-2Δ* strain and expressed from the endogenous *rpl30-2* promoter. We confirmed that our *rpl30-2* ribozyme construct

expressed a non-polyadenylated transcript by RNase H assays. As can be seen in Fig. 3B, analysis of RNase H reactions from a strain that expressed the normal *rpl30-2* gene showed heterogeneous 3' products (lane 2) that collapsed into a discrete product (lane 1) after addition of oligo d(T). This loss of heterogeneity after oligo d(T) treatment is consistent with polyadenylated *rpl30-2* transcripts. In contrast, RNase H reactions using RNA prepared from a strain expressing the *rpl30-2* ribozyme construct yielded a single product with or without the addition of oligo d(T) (Fig. 3B, lanes 3-4), confirming that the *rpl30-2* transcripts expressed from the ribozyme construct are not polyadenylated.

We next deleted *pab2* and *rrp6* in strains expressing normal and ribozyme-processed *rpl30-2* to address the importance of polyadenylation in Pab2/Rrp6-dependent control of *rpl30-2* expression. Consistent with our previous results, *rpl30-2* pre-mRNA and mRNA were both upregulated in *pab2Δ* and *rrp6Δ* mutant strains (Fig. 3C, lanes 1-3). In contrast, the expression of non-polyadenylated *rpl30-2* from the ribozyme construct was largely insensitive to Pab2- and Rrp6-dependent degradation (Fig. 3C, lanes 4-6). Quantification analysis from independent experiments confirmed that the non-polyadenylated *rpl30-2* pre-mRNA is not sensitive to Pab2/Rrp6-dependent decay (Fig. 3D). Similar results were obtained using the terminator of the *snu2* gene, which encodes the non-polyadenylated U2 small nuclear (sn) RNA (Fig. S3B). These data argue for the direct role of Pab2 and Rrp6 in the control of *rpl30-2* expression by a polyadenylation-dependent mechanism.

In addition to the absence of a 3' poly(A) tail, the *rpl30-2* ribozyme construct is unlikely to be cleaved by the canonical 3' end mRNA processing complex. To address the importance of polyadenylation independently of 3' end processing, variants of Pab2 that are defective in binding to a poly(A) tail were used. The ability of Pab2 to bind a poly(A) substrate was completely lost after the substitution of a conserved phenylalanine (F75R) residue within the RNA recognition motif of Pab2 (Figs. S3C-S3D). Similarly, a Pab2 variant in which the eleven arginine residues within the arginine/glycine-rich domain were substituted to alanine (R-to-A) showed no poly(A) binding (Fig. S3). Importantly, Pab2 variants F75R and R-to-A did not rescue the increased levels of *rpl30-2* transcripts

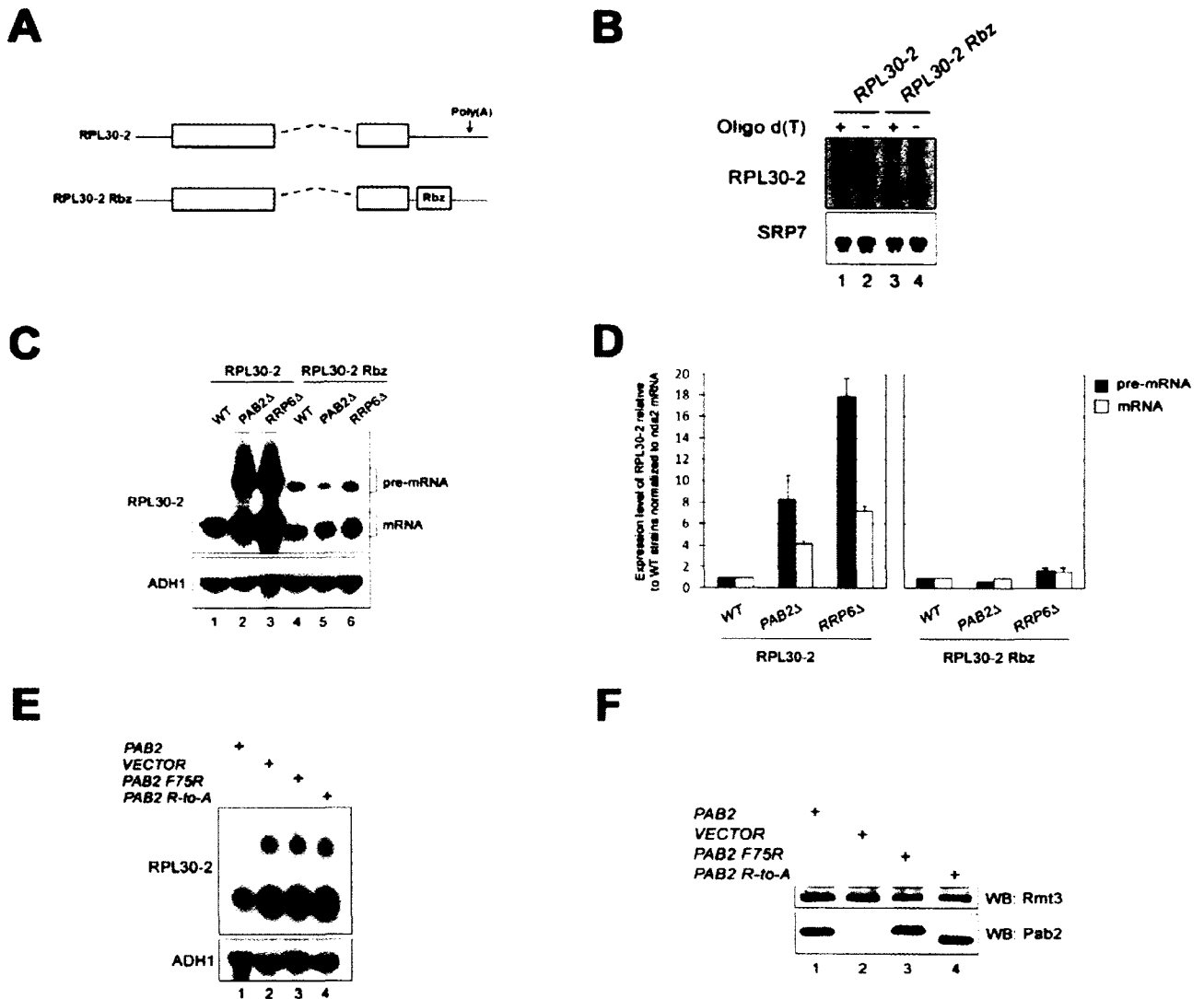


Figure 3. Polyadenylation is required for Pab2/Rrp6-dependent degradation of the *rpl30-2* pre-mRNA.

(A) Schematic of the *rpl30-2* ribozyme construct. (B) RNA prepared from strains that express the wild-type (lanes 1-2) and ribozyme-processed (lanes 3-4) *rpl30-2* was treated with RNase H in the presence of a DNA oligonucleotides complementary to *rpl30-2*. RNase H reactions were performed in the presence (+) or absence (-) of oligo(dT). *srp7* RNA was used as a loading control. (C) Northern blot analysis of total RNA prepared from wild-type (lanes 1 and 4), *pab2Δ* (lanes 2 and 5), and *rrp6Δ* (lanes 3 and 6) strains that

expressed polyadenylated (lanes 1-3) and non-polyadenylated (lanes 4-6) *rpl30-2* transcripts. (D) Quantitative RT-PCR analysis of *rpl30-2* RNA levels using the strains described in (C). The data and error bars represent the average and standard deviation from three independent experiments. (E) Northern blot analysis of *rpl30-2* using RNA from *pab2Δ* cells that were previously transformed with vectors expressing wild-type (lane 1), F75R (lane 3), and R-to-A (lane 4) versions of Pab2 as well as an empty vector control (lane 2). (F) Western blot (WB) analysis from the strains described in (E). The faster migration of the R-to-A variant of Pab2 is likely caused by charge alterations. See also Figure S3.

observed in the *pab2Δ* strain (Fig. 3E, lanes 2-4), although the two Pab2 variants defective in poly(A) binding were expressed at levels similar to wild-type Pab2 (Fig. 3F). As a control, expression of wild-type Pab2 in the *pab2Δ* strain effectively restored the altered levels of *rpl30-2* transcripts (Fig. 3E, lane 1). Collectively, these results are consistent with a polyadenylation-dependent mechanism that controls *rpl30-2* expression at the level of pre-mRNA turnover.

Pab2-dependent pre-mRNA decay is regulated during an environmental stress

A global analysis of gene expression changes in fission yeast found that heat stress causes the upregulation of *rpl30-2* (Chen et al., 2003). Accordingly, we found a 2-fold increase in *rpl30-2* mRNA levels after shifting cells growing at 25°C to 37°C (Fig. 4, lanes 1-2 and Fig. 4B). Notably, the temperature-dependent upregulation of *rpl30-2* required Pab2, as it was not observed in a *pab2Δ* strain that is defective in pre-mRNA decay (Fig. 4A, lanes 3-4 and Fig. 4B). Identical results were obtained using *rrp6Δ* cells (data not shown). These results suggest that the upregulation of *rpl30-2* mRNA after heat stress is mainly controlled at the level of pre-mRNA turnover. If negative control of pre-mRNA decay is mainly responsible for the upregulation of *rpl30-2* after heat shock, we predicted that *rpl30-2* expression from the intronless construct, which is insensitive to Pab2/Rrp6-mediated pre-mRNA decay (Fig. 1B-1C), would not respond to heat stress. Accordingly, a wild-type strain that expressed the intronless version of *rpl30-2* showed no increase in

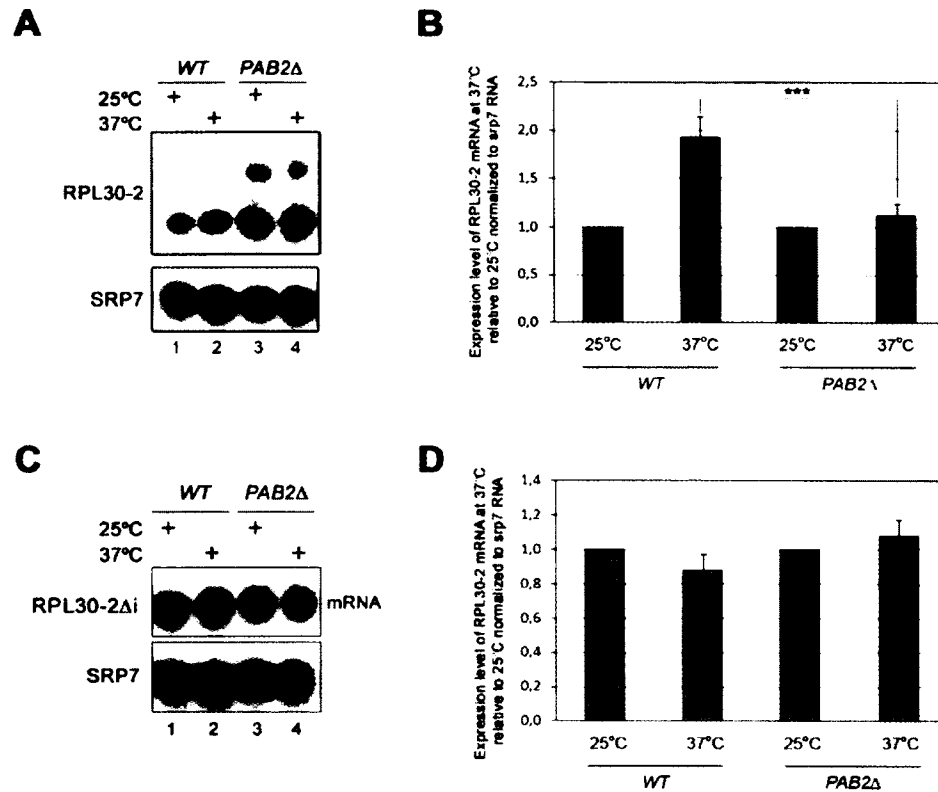


Figure 4. Regulation of Pab2-dependent pre-mRNA decay by heat stress.

(A) Northern blot analysis of RNA from wild-type (lanes 1-2) and *pab2Δ* (lanes 3-4) strains grown at 25°C (lanes 1 and 3) or after transfer to 37°C (lanes 2 and 4) for 3 h. Probes for *rpl30-2* and *srp7* were used. (B) Quantification of Northern blot data for *rpl30-2* mRNA. Values represent the means of five independent experiments and bars correspond to standard deviations (***p*<0.0001; Student's *t* test). (C) Northern blot analysis of RNA from *rpl30-2Δi* (lanes 1-2) and *rpl30-2Δi pab2Δ* (lanes 3-4) strains that express intronless *rpl30-2* (RPL30-2Δi) and that were grown at 25°C (lanes 1 and 3) or after transfer to 37°C (lanes 2 and 4) for 3 h. (D) Quantification of Northern blot data for *rpl30-2* mRNA. Values represent the means of three independent experiments and bars correspond to standard deviations.

mRNA levels after heat shock (Fig. 4C, lanes 1-2 and Fig. 4D). These results demonstrate that regulation by Pab2-dependent pre-mRNA decay is important to control gene expression during an environmental stress.

Identification of genes targeted by Pab2-dependent pre-mRNA decay.

We next asked whether Pab2-dependent pre-mRNA decay controls the expression of genes other than *rpl30-2*. We thus used next-generation sequencing to compare the levels of unspliced and spliced transcripts between wild-type and *pab2Δ* strains. We obtained >30 million reads for both wild-type and *pab2Δ* strains, which represents >60 genome lengths. Sequence reads were mapped to spliced and unspliced reference genomes to determine the position of each read relative to exon and intron sequences. To identify genes whose expression is influenced by Pab2-dependent pre-mRNA decay, we first analyzed the normalized number of exon-exon transreads (spliced intron) and exon-intron reads (unspliced intron) and isolated genes in which both unspliced and spliced transcripts showed >1.5-fold increase in the *pab2Δ* strain relative to the wild-type control. This analysis uncovered 58 genes with increased levels of pre-mRNA and mRNA in the absence of Pab2 (Table S1 and Fig. S4A). Although the exon-exon transread/exon-intron read analysis is highly specific for spliced and unspliced transcripts, respectively, it is based on a restricted number of sequencing reads. Therefore, we also analyzed the data by comparing the exon (total mRNA) and intron (unspliced mRNA) signals for each gene between wild-type and *pab2Δ* strains (Mortazavi et al., 2008). Using this analysis, we identified 59 genes with upregulated levels of total and unspliced mRNAs (Table S2 and Fig. S4B). Significantly, of the 59 Pab2-regulated genes identified using the exon/intron signal analysis, 21 (36%; $P < 1 \times 10^{-15}$) were identified using the exon-exon transread/exon-intron read analysis (Fig. 5A; Table S3). Notably, *rpl30-2* was identified using both approaches. Using two independent analyses, the RNA-seq approach thus identified a high-confidence list of genes that demonstrate concomitant upregulation of mature mRNA and unspliced pre-mRNA in the absence of Pab2.

To validate the accuracy of this transcriptome analysis, we randomly selected 5 single-intron genes and performed quantitative RT-PCR analysis to assess pre-mRNA levels in *pab2Δ* cells compared to a wild-type strain. Consistent with the RNA-seq analysis, all of the tested genes demonstrated increased levels of spliced and unspliced transcripts in the *pab2Δ* strain (Fig. 5B), compatible with a pathway of pre-mRNA decay that competes with pre-mRNA splicing. We also analyzed a few genes that were identified by the RNA-seq approach and that have multiple introns. Interestingly, we found that not all introns within a gene show Pab2-dependent regulation. An example of this is shown in Fig. 5C. The level of intron-exon signal corresponding to intron-2 of *dbp2* increased 3.5-fold in the *pab2Δ* strain; yet, the intron-exon signal for intron-1 did not. This result suggests that the majority of *dbp2* pre-mRNAs targeted by Pab2-dependent pre-mRNA decay have spliced their 5' intron, but not their 3' intron.

Analyses of the genes controlled by Pab2-dependent pre-mRNA decay did not show any bias for intron length and position. However, we found that genes within the high-confidence list are significantly less efficiently spliced than the rest of fission yeast intron-containing genes ($P=0.01$). This observation predicted that replacing the inefficiently spliced *rpl30-2* intron by an efficiently spliced intron would reduce pre-mRNA decay by Pab2. We chose to replace the *rpl30-2* intron with the intron of another ribosomal protein-coding gene, *rps3*, because it is efficiently spliced (Fig. S4C) and it is similar in length to the *rpl30-2* intron (Fig. 5D). Consistent with this prediction, *rpl30-2* pre-mRNAs that contain the *rps3* intron were resistant to Pab2-dependent decay (Fig. 5E, lanes 3-4). In contrast, *rpl30-2* pre-mRNAs that contain introns from genes that are regulated by Pab2 (*dbp2* and *rpl1-2*; see Fig. 5B-5C) were still substrate of Pab2-dependent decay (Fig. 5E, lanes 7-10). Taken together, our transcriptome analysis indicates that gene regulation by Pab2-dependent pre-mRNA decay is not limited to *rpl30-2*, and extends to inefficiently spliced genes associated with different functions.

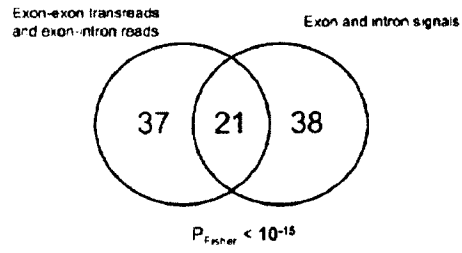
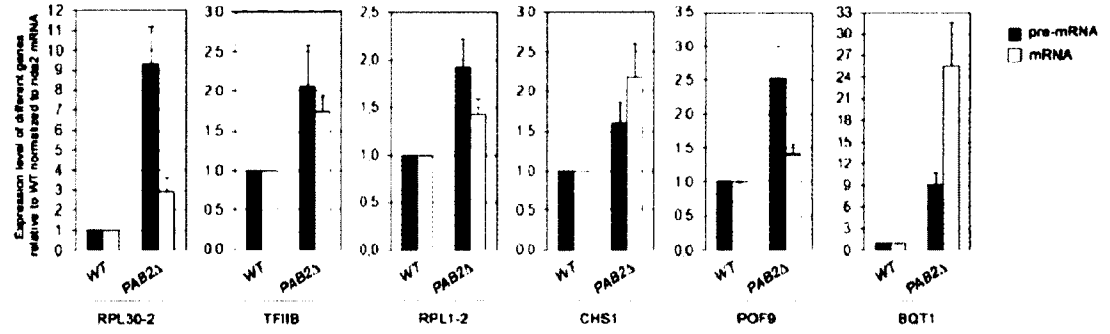
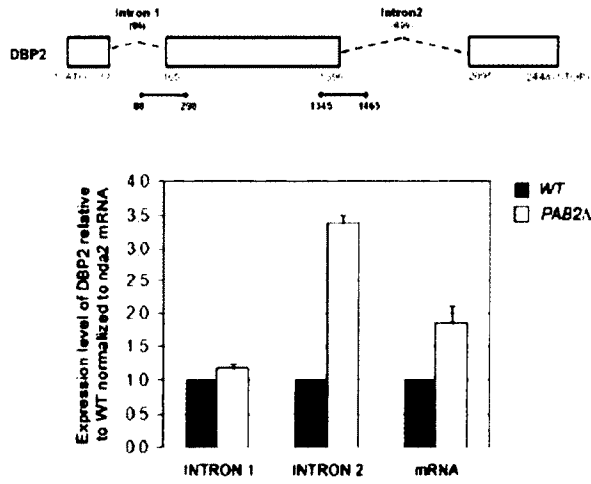
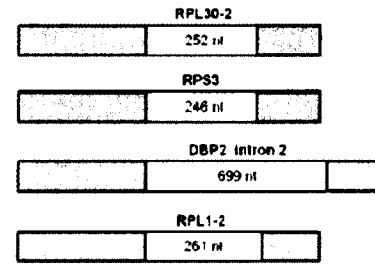
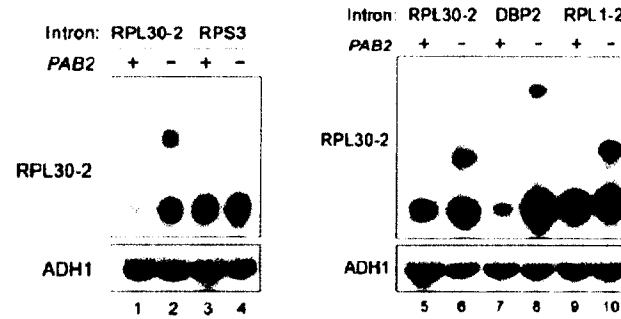
A**B****C****D****E**

Figure 5

Figure 5. The expression of several genes is controlled by Pab2-dependent pre-mRNA turnover.

(A) Venn diagram depicting the number of overlapping genes from the lists of genes that showed increased levels of spliced and unspliced mRNA using the exon-exon transreads/exon-intron reads analysis and the exon/intron signals analysis. The P value (Fisher's exact test) indicates the probability that the observed overlap occurred by chance. See also Figure S4. (B) Validation of high-throughput sequencing results by quantitative RT-PCR using primers across exon-exon (mRNA) and exon-intron (pre-mRNA) junctions. The data and error bars represent the average and standard deviation from three independent experiments. (C) *Top*; Schematic of the *dbp2* gene with its two introns (dashed lines). Bars under the *dbp2* gene show the position of PCR products used for analyses in RT-PCR assays. *Bottom*; RT-PCR data to quantify the expression level of *dbp2* introns between wild-type and *pab2Δ* cells using primers across exon-intron junctions for introns 1 and 2. The data and error bars represent the average and standard deviation from three independent experiments. (D) Schematic of *rpl30-2* constructs with *rpl30-2*, *rps3*, *dbp2*-intron 2, and *rpl1-2* introns used to study *rpl30-2* expression in Fig. 5E. (E) Northern analysis of RNA from wild-type (lanes 1, 3, 5, 7, and 9) and *pab2Δ* (lanes 2, 4, 6, 8, and 10) strains expressing *rpl30-2* using the *rpl30-2* (lanes 1, 2, 5, and 6), the *rps3* (lanes 3-4), the *dbp2* intron-2 (lanes 7-8), and *rpl1-2* (lanes 9-10) introns.

Negative splicing regulation promotes pre-mRNA decay by Pab2.

The aforementioned transcriptome analysis indicated that genes regulated by Pab2-dependent pre-mRNA decay are inefficiently spliced. However, this does not distinguish constitutive inefficient splicing from specific regulation of splicing. To distinguish between these two possibilities, we explored possible mechanisms that may explain the poor splicing efficiency of *rpl30-2*. One clue to how *rpl30-2* splicing may be inefficient came from the characterization of *RPL30* splicing in *S. cerevisiae*. In contrast to fission yeast, a single gene encodes Rpl30 in budding yeast. Interestingly, *RPL30* expression is regulated autogenously in *S. cerevisiae*, whereby the Rpl30 protein can bind the *RPL30* pre-mRNA and inhibit splicing (Dabeva et al., 1986; Macias et al., 2008). Because two paralogous genes express Rpl30 in *S. pombe*, we investigated the role of Rpl30-1 in the regulation of *rpl30-2* expression. Strikingly, we noted a 6-fold decrease in the percentage of unspliced *rpl30-2* transcript in the absence of Rpl30-1 relative to wild-type (Fig. S5A), which coincided with a substantial upregulation of the *rpl30-2* mRNA (Fig. 6A, compare lanes 1 and 3). These data are consistent with greater *rpl30-2* splicing efficiency in the absence of Rpl30-1. The effect of Rpl30-1 on *rpl30-2* expression is specific, as mRNA levels for other ribosomal protein-coding genes were unaffected in cells deficient for Rpl30-1 (Fig. S5B). Notably, we found that the *rpl30-2* intron was important for the negative regulation of *rpl30-2* expression by Rpl30-1: the impact of Rpl30-1 deficiency on *rpl30-2* expression was reduced by 4-fold when *rpl30-2* was expressed from the intronless construct (Fig. 6B, lanes 3-4; Fig. 6C) as well as from a construct in which the *rpl30-2* intron was replaced by the intron of the *rps3* ribosomal protein gene (Fig. 6B, lanes 5-6; Fig. 6C). From these results, we conclude that Rpl30-1 negatively regulates *rpl30-2* expression by a mechanism that requires the *rpl30-2* intron.

The requirement of the *rpl30-2* intron for the negative regulation by Rpl30-1 suggested that Rpl30-1 might inhibit *rpl30-2* splicing. If this is the case, excess Rpl30-1 should lead to *rpl30-2* downregulation. To test this, we expressed *rpl30-1* from the inducible *nmt1⁻* promoter, which is induced in the absence of thiamine. In agreement with the direct role of Rpl30-1 in the control of *rpl30-2* expression, excess Rpl30-1 resulted in decreased levels of *rpl30-2* mRNA (Fig. 6D, lane 4). As a control, cells carrying the empty

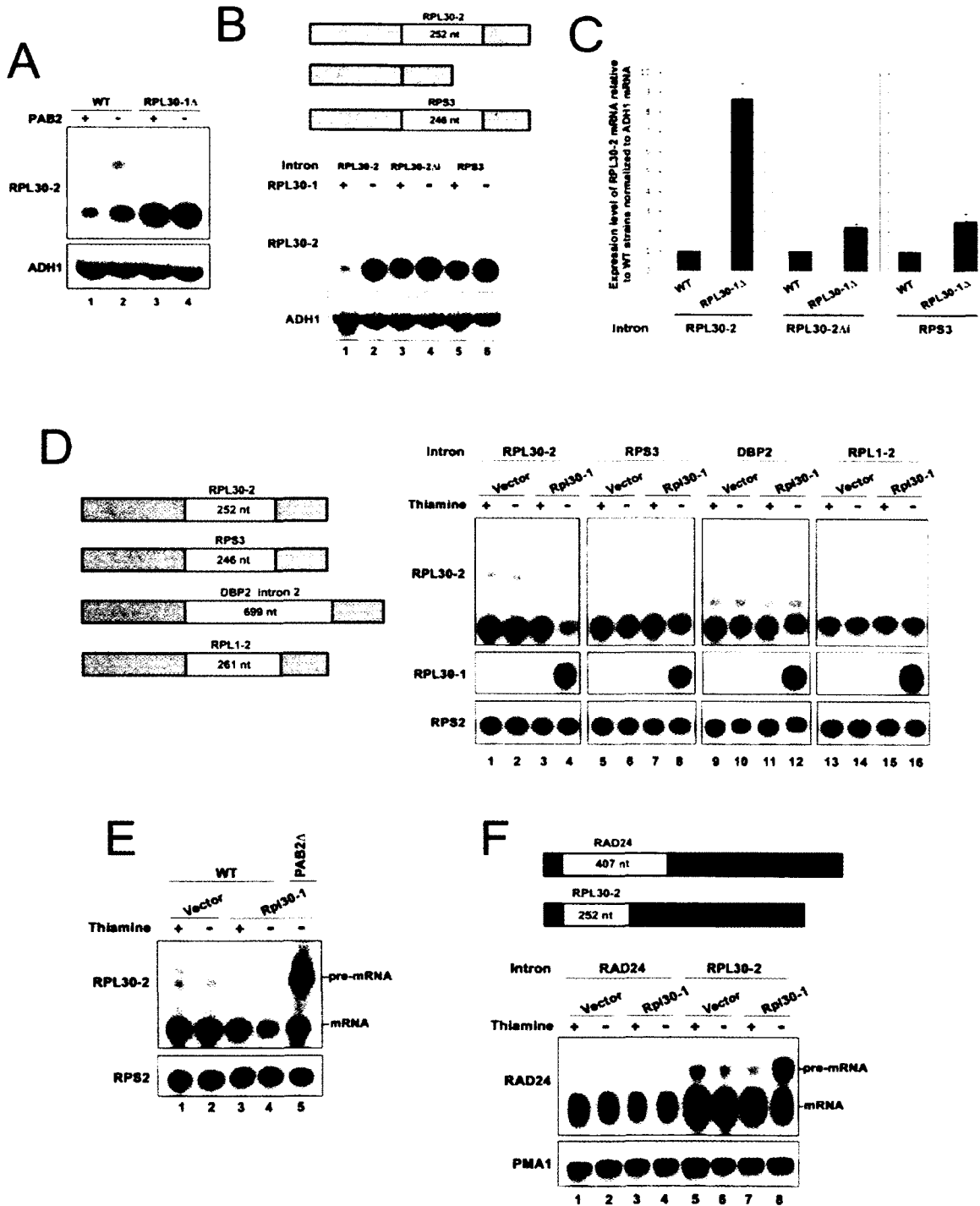


Figure 6

Figure 6. Splicing inhibition promotes pre-mRNA decay by Pab2.

(A) Northern analysis of RNA from wild-type (lanes 1), *pab2* Δ (lane 2), *rpl30-1* Δ (lanes 3), and *pab2* Δ *rpl30-1* Δ (lane 4) strains. The blot was probed for *rpl30-2* and *adh1* mRNAs. (B) Northern analysis of RNA from wild-type (lanes 1, 3, and 5) and *rpl30-1* Δ (lanes 2, 4, and 6) strains expressing *rpl30-2* using the *rpl30-2* (lanes 1-2) and the *rps3* (lanes 5-6) introns, as well as using the intronless (Δ i; lanes 3-4) construct. (C) Quantification of Northern data for *rpl30-2* mRNA. Values represent the means of three independent experiments and bars correspond to standard deviations. See also Figure S5. (D) Northern blot analysis of RNA from cells that express *rpl30-2* using the *rpl30-2* (lanes 1-4), *rps3* (lanes 5-8), *dbp2* intron-2 (lanes 9-12), and *rpl1-2* (lanes 13-16) introns and that were previously transformed with a plasmid that express *rpl30-1* and the control plasmid vector. Cells were grown in the presence (+) and absence (-) of thiamine to induce *rpl30-1* expression. (E) Northern blot analysis of RNA from wild-type (lanes 1-4) and *pab2* Δ (lane 5) strains that were previously transformed with a plasmid that express *rpl30-1* (lanes 3-5) and the control plasmid (lanes 1-2). Cells were grown in the presence (+) and absence (-) of thiamine to induce *rpl30-1* expression. (F) Northern blot analysis of RNA from *rad24* Δ cells that express *rad24* using the *rad24* (lanes 1-4) and *rpl30-2* (lanes 5-8) intron. Cells were grown in the presence (+) and absence (-) of thiamine.

vector did not show this thiamine-dependent decrease in *rpl30-2* expression (Fig. 6D, lanes 1-2). Consistent with the results using the *rpl30-1Δ* strain (Fig. 6B), the effect of excess Rpl30-1 on *rpl30-2* expression required the *rpl30-2* intron: RNA levels derived from *rpl30-2* that was fused to heterologous introns were not affected by excess Rpl30-1 (Fig. 6D, lanes 5-16). Importantly, excess Rpl30-1 in *pab2Δ* cells resulted in the accumulation of *rpl30-2* pre-mRNA (Fig. 6E, lanes 5), consistent with the *rpl30-2* pre-mRNAs targeted for splicing inhibition by Rpl30-1 being rapidly degraded via Pab2-dependent decay. These results indicate that the ability of Rpl30-1 to downregulate *rpl30-2* expression requires Pab2-dependent pre-mRNA decay. We also tested whether the *rpl30-2* intron was sufficient to induce gene regulation by Rpl30-1 by inserting the *rpl30-2* intron into a heterologous gene. We chose *rad24* because it is a non-ribosomal protein gene whose expression is not affected by Pab2 deficiency (Lemay et al., 2010). As a control, excess Rpl30-1 did not affect the levels of *rad24* transcripts (Fig. 6F, lanes 3-4). In contrast, decreased mRNA and increased pre-mRNA levels were detected in conditions of excess Rpl30-1 when *rad24* was expressed using the *rpl30-2* intron (Fig. 6F, lane 8). These results are consistent with the *rpl30-2* intron being the main element required for negative gene regulation by Rpl30-1.

We also investigated potential genetic interactions between *rpl30-1* and *pab2* in the regulation of *rpl30-2* expression. The increase in *rpl30-2* expression in the *pab2Δ* mutant was less compared to that observed in *rpl30-1Δ* cells (Fig. 6A, compare lanes 2-3); however, the single *rpl30-1Δ* mutant strain demonstrated *rpl30-2* mRNA levels similar to cells deficient for both *pab2* and *rpl30-1* (Fig. 6A, lanes 3-4), suggesting that Rpl30-1 acts upstream of Pab2. Altogether, the data presented in Fig. 6 suggest a cross-regulatory mechanism in which Rpl30-1 inhibits *rpl30-2* splicing to sensitize the unspliced polyadenylated *rpl30-2* pre-mRNA to Pab2-dependent decay.

DISCUSSION

In this study, we identified an unexpected role for a poly(A)-binding protein in the control of gene expression via the nuclear degradation of selective pre-mRNAs. We provide insight into how this pre-mRNA decay pathway targets specific intron-containing genes, as well as to the role of this nuclear pathway in the coordinated control of gene expression.

Pab2: a cofactor for TRAMP-independent exosome degradation of polyadenylated transcripts.

The poly(A) polymerase (PAP) activity of the TRAMP complex is believed to mark the bulk of RNAs targeted for exosome-mediated degradation during nuclear RNA surveillance. Our analyses, however, suggest that the PAP activity of the TRAMP complex is not required for the polyadenylation-dependent pre-mRNA degradation pathway described in this study. This conclusion is supported by the absence of change in *rpl30-2* pre-mRNA and mRNA levels in the *cid14Δ* strain (Fig. 2). Moreover, a polymerization-independent role for the TRAMP complex can be excluded, as Mtr4 and Air1 deficiency did not affect *rpl30-2* expression (Fig. 2 and data not shown). Rather, pre-mRNA decay by Pab2 is likely to be dependent on the canonical polyadenylation machinery, a conclusion consistent with the copurification of the fission yeast canonical mRNA poly(A) polymerase, Pla1, with Pab2 (Lemieux and Bachand, 2009).

We also identified the nuclear exosome, especially Rrp6, as the degradation machinery that functions with Pab2 to elicit pre-mRNA decay. Notably, the exosome appears to be the principal degradation machinery that functions with Pab2 during pre-mRNA decay, as strains defective for each of the three main deadenylation systems (Parker and Song, 2004), the CCR4-NOT complex, the poly(A) nuclease (PAN) complex, and the poly(A) ribonuclease (PARN) did not show increased levels of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA (Fig. S6A). Given the physical interaction between Pab2 and the nuclear exosome (Lemay et al., 2010), together with the observations that: (i) Rrp6 did not target the nonpolyadenylated *rpl30-2* pre-mRNA (Fig. 3), and (ii) poly(A)-bound Pab2 was

required for RNA decay (Fig. 3), our data suggest that the degradation of unspliced pre-mRNAs via the nuclear exosome is promoted by poly(A)-bound Pab2. Notably, the pre-mRNA decay pathway described here appears functionally different than previously described nuclear discard pathways. First, Pab2-dependent pre-mRNA decay controls the expression of a specific set of genes (Fig. 5), whereas inactivation of the general pre-mRNA discard pathway appears to affect most intron-containing genes and is linked to mRNA quality control (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Torchet et al., 2002). Second, Rrp6 plays a minor role in the pre-mRNA discard pathway relative to the core exosome (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Torchet et al., 2002); in contrast, the main exonuclease activity associated with Pab2-dependent pre-mRNA decay involves Rrp6 (Fig. 2). Furthermore, whereas nuclear degradation of aberrantly spliced and read-through pre-mRNAs by the exosome requires the TRAMP-associated protein Mtr4 (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Torchet et al., 2002), the individual depletion of Mtr4 had no effect on *rpl30-2* expression (Fig. 2D). This argues that Pab2-dependent pre-mRNA decay does not represent a general mechanism of pre-mRNA surveillance, but a pre-mRNA turnover pathway used to regulate the expression of specific genes.

Gene-specific regulation by Pab2-dependent pre-mRNA decay.

Although Pab2 is recruited cotranscriptionally to several intronless and intron-containing genes (Lemay et al., 2010; Lemieux and Bachand, 2009), our transcriptome analysis by RNA-sequencing defined a specific set of genes regulated by Pab2-dependent pre-mRNA decay. As the RNA element bound by Pab2 is a widespread sequence (poly(A) tail), other factors/events are likely responsible for the specificity of pre-mRNA decay by Pab2. We and others have recently shown that Pab2 promotes the decay of specific meiotic transcripts via interactions with the Mmi1 RNA-binding protein, which recognizes *cis* elements within meiotic mRNAs (St-Andre et al., 2010; Yamanaka et al., 2010). However, experiments revealed that Mmi1 inactivation does not affect the expression of genes regulated by Pab2-dependent pre-mRNA decay (Fig. S6B), indicating that the pre-mRNA decay pathway described in this study is distinct from the Mmi1-dependent degradation pathway that targets meiotic transcripts. Rather, our RNA-seq analysis and intron swapping experiments (Fig. 5) indicated that poor splicing efficiency is important to dictate susceptibility to Pab2-

dependent pre-mRNA decay. In addition, we provide evidence that negative splicing regulation can promote the poor splicing efficiency required for this pre-mRNA decay pathway. Specifically, our results (Fig. 6) show that the Rpl30-1 protein acts upstream of Pab2 to inhibit, directly or indirectly, the splicing of *rpl30-2*. Given that in *S. cerevisiae* RPL30 binds its pre-mRNA to inhibit splicing (Vilardell and Warner, 1994), together with the strong homology (55% identity) between the 246-nt intron of *S. pombe rpl30-2* and the 230-nt intron of *S. cerevisiae RPL30*, it is likely that Rpl30-1 directly controls *rpl30-2* expression. Interestingly, the 59-nt-long *rpl30-1* intron is not subject to autogenous regulation in fission yeast, as excess Rpl30-1 did not perturb endogenous *rpl30-1* expression (data not shown). Our results support a model (Fig. 7) in which an RNA-binding protein, such as Rpl30-1, can interfere with the splicing of a specific gene and thereby promote nuclear pre-mRNA decay via Pab2 and Rrp6. As the inefficiently spliced *dbp2* and *rpl1-2* introns promoted Pab2-dependent decay (Fig. 5) independently of Rpl30-1 (Fig. 6), it will be interesting to learn whether Pab2-regulated genes such as *dbp2* and *rpl1-2* show regulated splicing via specific RNA-binding proteins, similar to *rpl30-2*. Given recent evidence indicating that inefficiently spliced transcripts tend to accumulate near sites of transcription (de Almeida et al., 2010; Eberle et al., 2010), it is tempting to speculate that splicing inhibition by a *trans*-acting factor such as Rpl30-1 could prolong the nuclear residency of an unspliced transcript, thereby increasing its susceptibility to Pab2-dependent pre-mRNA decay.

Cross-regulation between paralogous ribosomal protein genes via nuclear pre-mRNA decay.

Negative feedback regulation is a common theme among RNA-binding proteins, notably ribosomal proteins, which allows coordinated expression between ribosomal proteins and rRNAs. In *E. coli*, when ribosomal proteins accumulate in excess, many of them can bind their own mRNA and negatively control its translation (Nomura et al., 1984). In budding yeast, excess ribosomal proteins are available to bind their pre-mRNA and prevent gene expression via NMD (Fewell and Woolford, 1999; Vilardell et al., 2000). Our data extend these previous observations of feedback regulation by the identification of a mechanism of cross-regulation between paralogous ribosomal proteins through nuclear

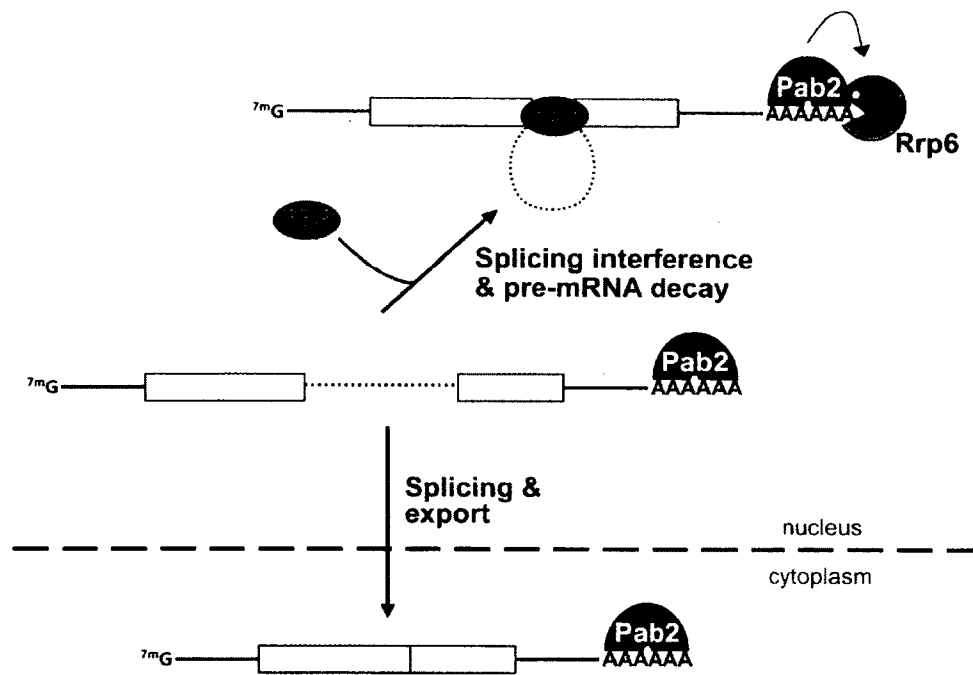


Figure 7. Model for gene regulation by nuclear pre-mRNA decay.

For Pab2-regulated genes, pre-mRNA decay actively competes with RNA processing. Specific RNA-binding proteins (RBP), such as Rpl30-1, can interfere with RNA splicing and promote nuclear pre-mRNA decay via Pab2 and Rrp6. The equilibrium between decay and processing of the pre-mRNA is therefore influenced by splicing regulation, which provides a mechanism to control gene expression

pre-mRNA decay. Accordingly, many ribosomal proteins are encoded from pairs of paralogous genes in yeast, as a consequence of an ancient genome duplication event (Wolfe and Shields, 1997). Furthermore, evidence has been presented suggesting that paralogous ribosomal proteins could be functionally distinct (Komili et al., 2007). Therefore, the nuclear pre-mRNA decay pathway described in this study is likely important to maintain coordinated expression levels between paralogous ribosomal proteins. This could be valuable if Rpl30-2 has a specialized role during heat stress, during which the down-regulation of *rpl30-1* (Chen et al., 2003) predicts the up-regulation of *rpl30-2*, consistent with our results (Figs. 4 and 6A).

Although the detailed mechanism by which Rpl30-1 interferes with *rpl30-2* splicing remains to be determined, our data suggest the existence of a negative regulatory element in the *rpl30-2* pre-mRNA. Part of this regulatory element is located within the *rpl30-2* intron, as this intron was sufficient to promote regulation of a heterologous gene by Rpl30-1 (Fig. 6F). Yet, the fact that the intronless *rpl30-2* construct still showed some sensitivity to Rpl30-1 deficiency suggests that exonic sequences are also important. These observations are reminiscent of the situation in *S. cerevisiae*, where splicing inhibition of *RPL30* by its gene product involves binding to a region at an exon-intron boundary of the pre-mRNA (Vilardell and Warner, 1994). However, whereas splicing inhibition by *S. cerevisiae* RPL30 promotes RNA decay via cytosolic NMD (Vilardell et al., 2000), we showed that negative regulation of *S. pombe rpl30-2* by Rpl30-1 promotes nuclear pre-mRNA decay via Pab2 and the exosome.

In summary, we have uncovered a nuclear pre-mRNA decay pathway that controls the expression of specific genes. Many of the controlled genes are inefficiently spliced, likely because of negative splicing regulation. We also provide evidence supporting the importance of this nuclear pre-mRNA decay pathway in maintaining balanced levels of paralogous ribosomal proteins. Our findings argue that in addition to transcriptional control, the turnover of specific pre-mRNAs (besides turnover of mature mRNAs) represents a layer of regulation in the nucleus to control gene expression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and Media. The strains of *S. pombe* used in this study are listed in Table S4. *S. pombe* was grown at 30°C in yeast extract medium with amino acid supplements (YES) unless otherwise noted.

DNA Constructs. Owing to the large number of constructs, the relevant information is provided in the Supplementary Methods.

RNA Analyses. Total RNA was analysed on agarose-formaldehyde gels and transferred onto nitrocellulose membranes. DNA probes were either 5'-labeled gene-specific oligos or random-primed PCR products. To prevent cross-hybridization between *rpl30* paralogs, sequence-specific probes were used to distinguish *rpl30-1* and *rpl30-2*. Visualization and quantification of signals were analyzed using a Typhoon Trio instrument (GE Healthcare). RNase H (Lemay et al., 2010) and real-time PCR (St-Andre et al., 2010) analyses were performed as previously described.

Chromatin Immunoprecipitation assays. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as previously described (Lemieux and Bachand, 2009).

RNA-seq library preparation and analysis. Strand-specific RNA-seq libraries were obtained using an unreleased early version provided by Illumina of the Illumina TruSeq Small RNA Sample Prep Kit and sequenced on an Illumina Genome Analyzer Iix instrument. The detailed description of the library preparation, sequencing, and data analysis can be found in the supplementary methods section.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Tokio Tani for the *prp* mutant strains; Justyna Osinska and Tony Brooks from UCL Genomics for running of the Illumina sequencers; JF Lemay for the *mtr4* conditional strain; Sherif Abou Elela and Benoit Chabot for critical reading of the manuscript. This work was funded by grants from CIHR to F. B. and from Cancer Research UK to J.B. C.L. was supported by a Scholarship from CIHR. F.B. is the recipient of a New Investigator Award from the CIHR.

REFERENCES

- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *Embo J* 18, 5399-5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev* 13, 2148-2158.
- Bird, G., Fong, N., Gatlin, J. C., Farabaugh, S., and Bentley, D. L. (2005). Ribozyme cleavage reveals connections between mRNA release from the site of transcription and pre-mRNA processing. *Mol Cell* 20, 747-758.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* 139, 547-559.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.
- Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chrétien, N., Tomé, F. M., Lafrenière, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., *et al.* (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18, 164-167.
- Callahan, K. P., and Butler, J. S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res* 36, 6645-6655.
- Callahan, K. P., and Butler, J. S. (2010). TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *J Biol Chem* 285, 3540-3547.
- Chekanova, J. A., Gregory, B. D., Reverdatto, S. V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., *et al.* (2007). Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell* 131, 1340-1353.

Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* *14*, 214-229.

Dabeva, M. D., Post-Beittenmiller, M. A., and Warner, J. R. (1986). Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 5854-5857.

de Almeida, S. F., Garcia-Sacristan, A., Custodio, N., and Carmo-Fonseca, M. (2010). A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Res.*

Dez, C., Houseley, J., and Tollervey, D. (2006). Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *25*, 1534-1546.

Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Seraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 15-22.

Eberle, A. B., Hesse, V., Helbig, R., Dantoft, W., Gimber, N., and Visa, N. (2010). Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS One* *5*, e11540.

Fasken, M. B., and Corbett, A. H. (2009). Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol* *6*, 237-241.

Fewell, S. W., and Woolford, J. L., Jr. (1999). Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol Cell Biol* *19*, 826-834.

Grzechnik, P., and Kufel, J. (2008). Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast. *Mol Cell* *32*, 247-258.

Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., and Silver, P. A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* *131*, 557-571.

- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* *121*, 713-724.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Seraphin, B. (2008). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* *456*, 993-996.
- Lemay, J. F., D'Amours, A., Lemieux, C., Lackner, D. H., St-Sauver, V. G., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol Cell* *37*, 34-45.
- Lemieux, C., and Bachand, F. (2009). Cotranscriptional recruitment of the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 to nascent transcripts and association with translating mRNPs. *Nucleic Acids Res* *37*, 3418-3430.
- Liu, Q., Greimann, J. C., and Lima, C. D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* *127*, 1223-1237.
- Macias, S., Bragulat, M., Tardiff, D. F., and Vilardell, J. (2008). L30 binds the nascent RPL30 transcript to repress U2 snRNP recruitment. *Mol Cell* *30*, 732-742.
- Meaux, S., and Van Hoof, A. (2006). Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *Rna* *12*, 1323-1337.
- Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., and Tollervey, D. (2005). A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol Cell Biol* *25*, 9996-10004.
- Moore, M. J., and Proudfoot, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* *136*, 688-700.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* *5*, 621-628.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu Rev Biochem* *53*, 75-117.

- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 121-127.
- Sayani, S., Janis, M., Lee, C. Y., Toesca, I., and Chanfreau, G. F. (2008). Widespread impact of nonsense-mediated mRNA decay on the yeast intronome. *Mol Cell* *31*, 360-370.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C. M., and van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 56-62.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res* *37*, 1127-1140.
- Shcherbik, N., Wang, M., Lapik, Y. R., Srivastava, L., and Pestov, D. G. (2010). Polyadenylation and degradation of incomplete RNA polymerase I transcripts in mammalian cells. *EMBO Rep* *11*, 106-111.
- St-Andre, O., Lemieux, C., Perreault, A., Lackner, D. H., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(a)-binding protein in fission yeast. *J Biol Chem* *285*, 27859-27868.
- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., and Tollervey, D. (2002). Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol Cell* *9*, 1285-1296.
- Urushiyama, S., Tani, T., and Ohshima, Y. (1997). The *prp1+* gene required for pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein that contains TPR motifs and is similar to Prp6p of budding yeast. *Genetics* *147*, 101-115.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol* *20*, 441-452.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* *3*, e189.

Vilardell, J., Chartrand, P., Singer, R. H., and Warner, J. R. (2000). The odyssey of a regulated transcript. *Rna* 6, 1773-1780.

Vilardell, J., and Warner, J. R. (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes Dev* 8, 211-220.

Win, T. Z., Draper, S., Read, R. L., Pearce, J., Norbury, C. J., and Wang, S. W. (2006). Requirement of fission yeast Cid14 in polyadenylation of rRNAs. *Mol Cell Biol* 26, 1710-1721.

Wolfe, K. H., and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713.

Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J. C., Dufour, M. E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., *et al.* (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725-737.

Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., and Yamamoto, M. (2010). Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *Embo J* 29, 2173-2181.

SUPPLEMENTARY FIGURES

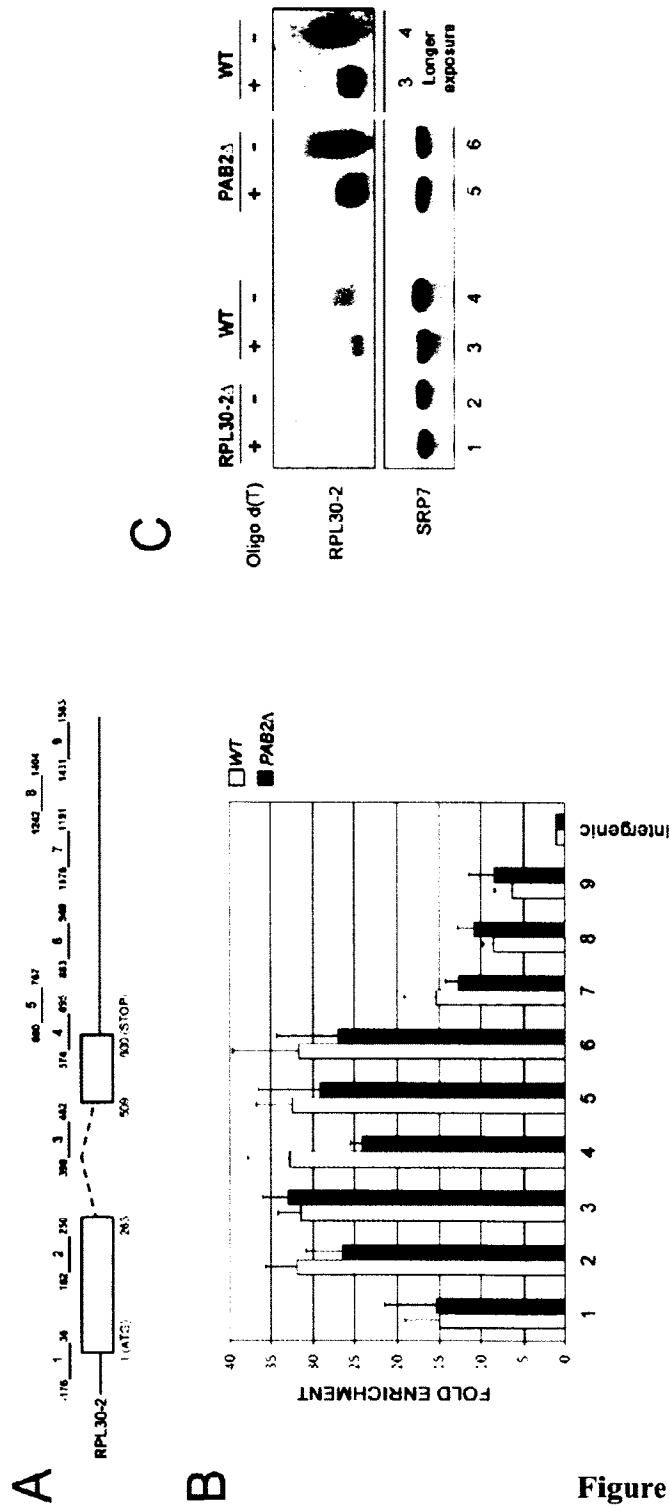


Figure S 1, related to Figure 1. Normal transcription and 3' end processing of *rpl30-2* in wild-type and *pab2Δ* strain.

(A) The absence of Pab2 does not affect the density of RNA Pol II at the *rpl30-2* locus. Schematic diagram of *rpl30-2* gene. Boxes and the dashed line represent exons and the intron, respectively. Nucleotides numbers are relative to the initiation codon. Bars above the gene show the position of PCR products used for analyses in ChIP assays. The number above each bar is used for identification in panel B. An intergenic region served as the internal control.

(B) ChIP assays were performed on extracts prepared from wild-type and *pab2Δ* strains using a monoclonal antibody specific to RNA Pol II. The coprecipitating DNA was quantified by real-time PCR using gene-specific primer pairs located along the *rpl30-2* gene (see panel A). All of the ChIP data are presented as the fold enrichment of RNA Pol II relative to a control intergenic region. Values represent the means of at least three independent experiments and bars correspond to standard deviations.

(C) Polyadenylation status of *rpl30-2* transcript in wild-type and *pab2Δ* cells. Total RNA prepared from wild-type (lanes 3-4), *rpl30-2Δ* (lanes 1-2), and *pab2Δ* (lanes 5-6) cells was treated with RNase H in the presence of a DNA oligonucleotide complementary to a region 80-nt upstream of the *rpl30-2* polyadenylation site. RNase H reactions were performed in the presence (+) or absence (-) of oligo(dT). The *srp7* RNA was used as a loading control. Consistent with the microarray and Northern results, we detected a ~5-fold increase in *rpl30-2* transcript in *pab2Δ* cells relative to wild-type cells (compare lanes 5-6 to 3-4). However, longer exposures of RNase H reactions using RNA from wild-type cells (lanes 3-4; right panel) indicated similar poly(A) tail length between wild-type and the *pab2Δ* mutant.

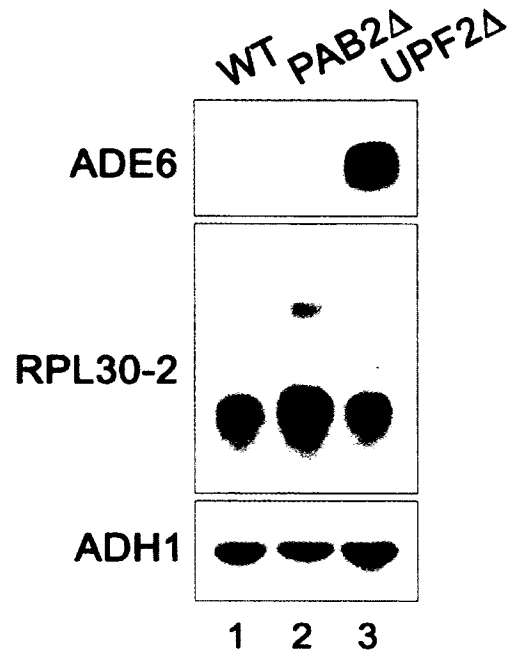


Figure S 2, related to Figure 2. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) does not control *rpl30-2* pre-mRNA levels.

Northern blot analysis of total RNA prepared from wild-type (lane 1), *pab2Δ* (lane 2), and *upf2Δ* (lane 3) strains that expressed the nonsense *ade6*-M375 allele. The blot was probed for the *ade6*, *rpl30-2*, and *adh1* transcripts. Levels of *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA were unchanged in the *upf2Δ* strain (compare lanes 1 and 3). As a control, mRNA levels from the nonsense *ade6*-M375 allele accumulated in the *upf2Δ* strain (lane 3), but not in the wild-type and *pab2Δ* strains (lanes 1 and 2).

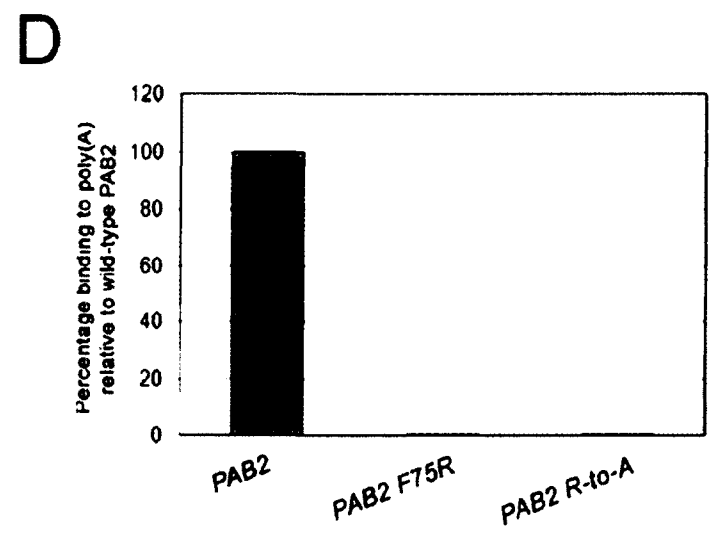
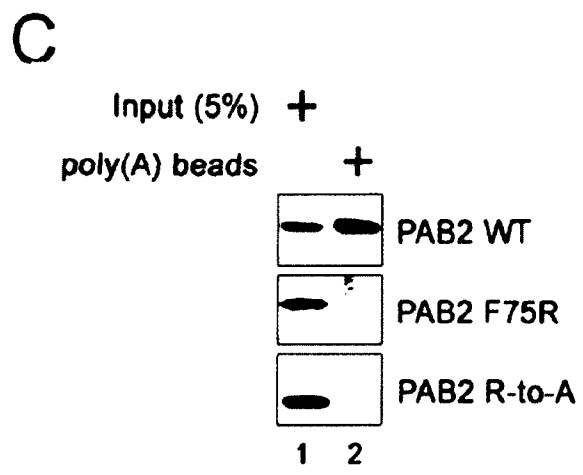
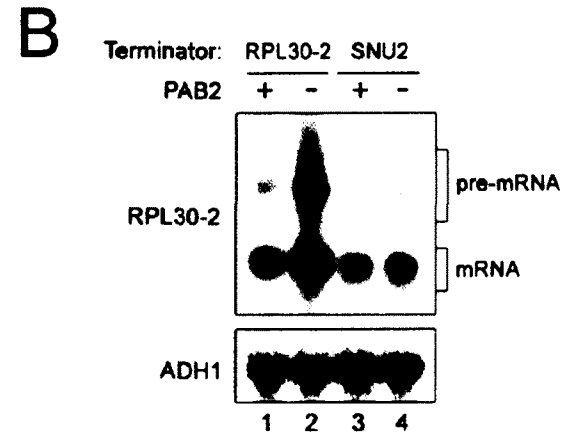
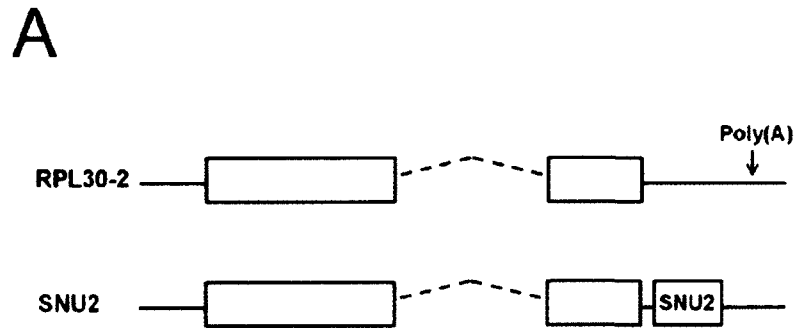


Figure S 3

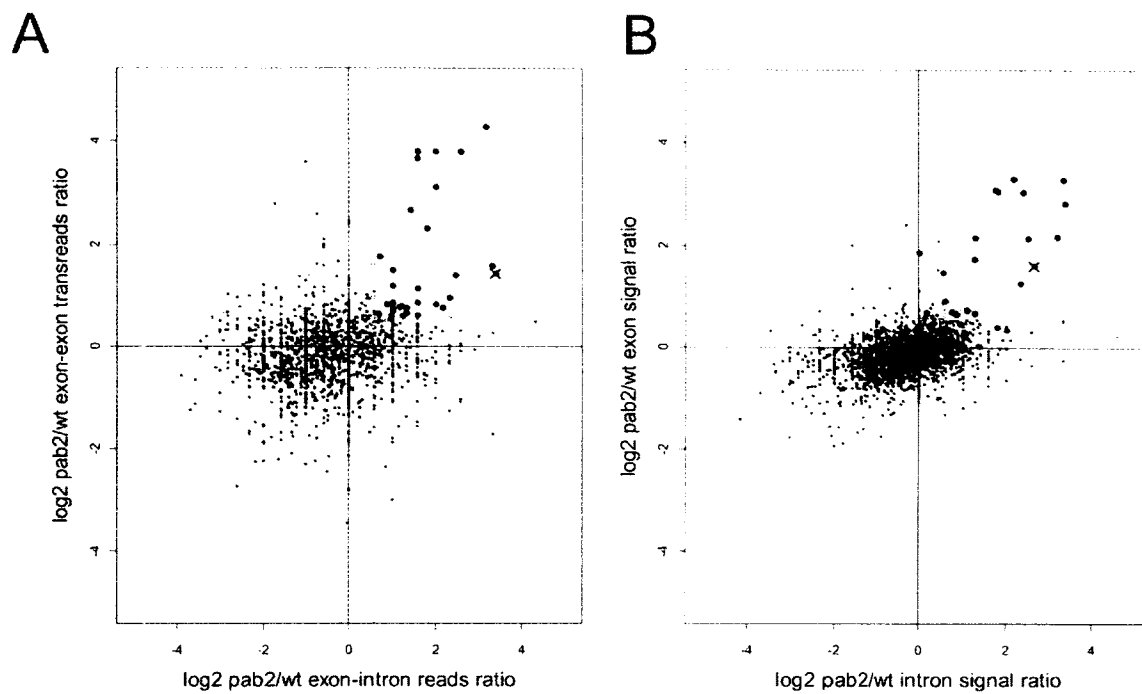
Figure S 3, related to Figure 3. Poly(A)-bound Pab2 is required for pre-mRNA decay.

(A) Schematic of wild-type *rpl30-2* and *rpl30-2:snu2* constructs. In the *rpl30-2:snu2* construct, the terminator of the nonpolyadenylated U2 snRNA (*snu2* gene) was inserted upstream of the *rpl30-2* polyadenylation signal.

(B) Northern blot analysis of total RNA prepared from wild-type (lanes 1 and 3) and *pab2Δ* (lanes 2 and 4) strains that expressed *rpl30-2* using normal (lanes 1-2) and *snu2* (lanes 3-4) terminators. The blot was probed for *rpl30-2* and *adh1* transcripts.

(C) Equal amounts of whole cell extracts prepared from *pab2Δ* cells that were previously transformed with vectors expressing wild-type, F75R, and R-to-A versions of Pab2 were incubated with poly(A)-sepharose beads before extensive washing and elution (lane 2). The level of Pab2 recovered was analyzed by Western blotting using a rabbit polyclonal antibody specific to fission yeast Pab2.

(D) The percentage of Pab2 binding to poly(A) was established as follows: signal ratio of copurified Pab2 over input. The ratios were normalized to wild-type Pab2, which was set to 100%. The data and error bars represent the average and standard deviation from four independent experiments.



C

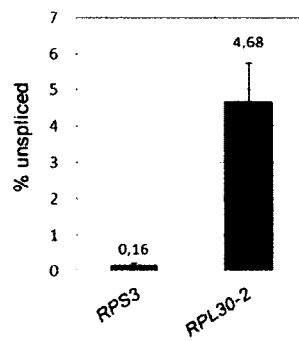


Figure S 4

Figure S 4, related to Figure 5. Analysis of Pab2-dependent pre-mRNA decay by RNA-sequencing. Coordinated upregulation of spliced and unspliced mRNA in *pab2Δ* cells.

(A) Scatter plot of the exon-exon transreads *pab2Δ*/wt ratio (y axis) and exon-intron reads *pab2Δ*/wt ratio (x axis) for all detected genes.

(B) Scatter plot of intron (x axis) and exon (y axis) *pab2Δ*/wt signal ratios for all detected genes. Horizontal and vertical orange lines mark ratio=1.5 cut off used in this study. Three gene lists were defined from these data. List 1: genes with exon-exon transreads ratios and exon-intron reads ratios > 1.5 (panel A and Fig. 5A left circle). List 2: genes with exon and intron signals ratios > 1.5 (panel B and Fig. 5A right circle). List 3: the overlap between List 1 and List 2. On both panels blue dots represent genes present in List 1 only; yellow dots genes present in List 2 only; and green dots genes present in both List 1 and List 2. The gene marked by “X” is *rpl30-2*. The discrepancy for a fraction of the two datasets is mostly due to the use of cut-offs. This is best illustrated for the exon/intron dataset (Fig. S4B): although a fraction of the genes from the exon-exon transread/exon-intron read dataset (blue dots) is at the top of the distribution of the exon/intron analysis, these genes from the transread analysis (blue dots) did not make the cut off. This is consistent with the transread analysis being highly sensitive, but more susceptible to experimental variation, strongly arguing in favor of our combined analysis approach.

(C) Random-primed cDNA prepared from RNA extracted from wild-type cells was analyzed by real-time PCR using intron-exon (pre-mRNA) and exon-exon (total RNA) primer pairs. The pre-mRNA:total RNA signal ratio allowed the calculation of the percentage of unspliced pre-mRNA for *rpl30-2* and *rps3*. Values represent the means of at least three independent experiments and bars correspond to standard deviations.

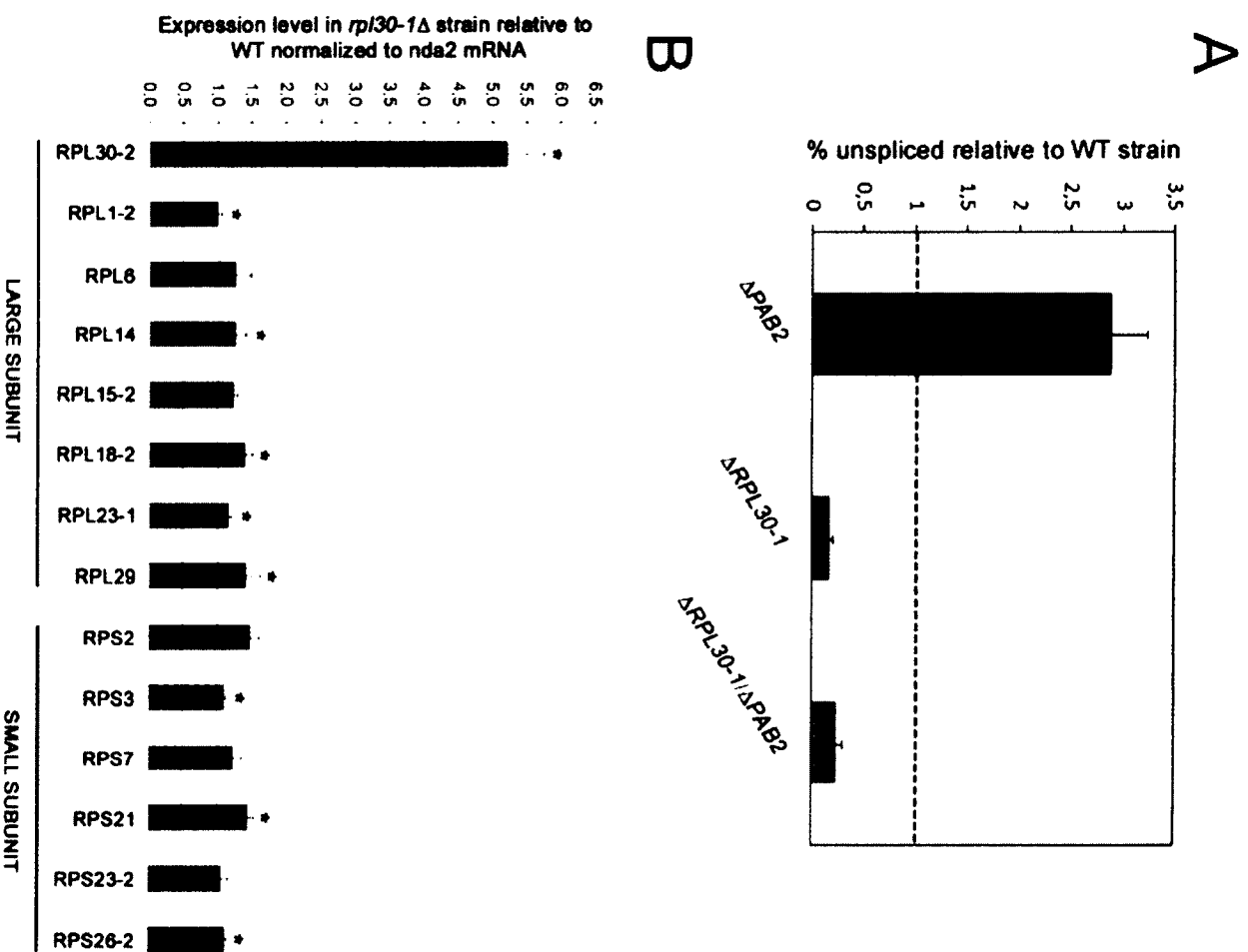


Figure S 5

Figure S 5, related to Figure 6. Cross-regulation of *rpl30-2* expression by Rpl30-1.

(A) Splicing ratio of *rpl30-2* in different mutant strains. Random-primed cDNA prepared using RNA extracted from wild-type, *pab2Δ*, *rpl30-1Δ*, and *rpl30-1Δ pab2Δ* cells was analyzed by real-time PCR using intron-exon (pre-mRNA) and exon-exon (total RNA) primer pairs. The pre-mRNA:total RNA signal ratio allowed the calculation of the percentage of unspliced pre-mRNA for *rpl30-2*. Values were then set to 1 for the wild-type strain. Values represent the means of at least three independent experiments and bars correspond to standard deviations.

(B) Specific control of *rpl30-2* expression by Rpl30-1. Random-primed cDNA prepared from RNA extracted from wild-type and *rpl30-1Δ* cells was analyzed by real-time PCR using primer pairs specific for the indicated ribosomal protein-coding genes. Expression levels in *rpl30-1Δ* are relative to the wild-type strain and normalized to the *nda2* mRNA. Asterisks (*) represent intron-containing ribosomal protein genes. Values represent the means of at least three independent experiments and bars correspond to standard deviations.

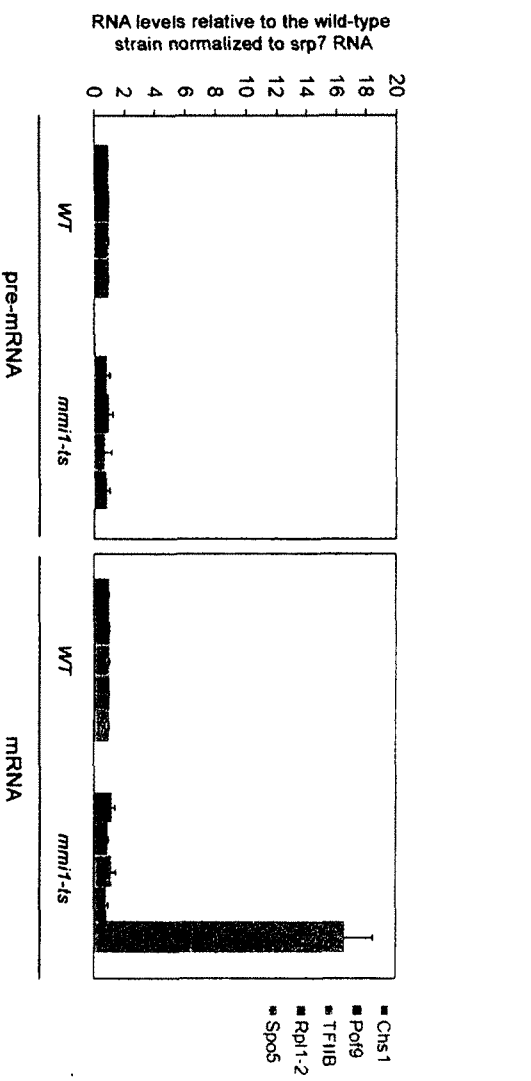
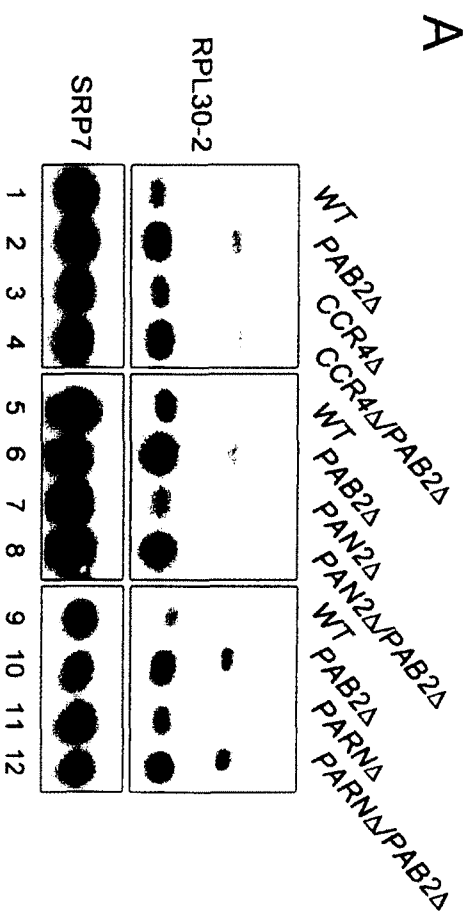


Figure S 6

Figure S 6, related to Figure 7 & Discussion. Pab2-dependent pre-mRNA decay is independent of deadenylation pathways and of the Mmi1 protein.

(A) Equal amounts of total RNA prepared from the indicated strains were analyzed by Northern blotting. Probes for *rpl30-2* and *srp7* were used. *rpl30-2* mRNA and pre-mRNA levels were unchanged in *ccr4Δ* (lane 3), *pan2Δ* (lane 7), and *parnΔ* (lane 11) strains relative to the wild-type control (lanes 1, 5, and 9). Furthermore, *ccr4Δ pab2Δ* (lane 4), *pan2Δ pab2Δ* (lane 8), and *parnΔ pab2Δ* (lane 12) double mutant strains showed *rpl30-2* transcript levels similar to the single *pab2Δ* strain (lanes 2, 6, and 10).

(B) Pab2-dependent pre-mRNA decay is distinct from the degradation pathway that targets specific meiotic transcripts. Real-time quantitative RT-PCR analysis of genes controlled by Pab2-dependent decay (*chs1*, *pof9*, *tfl1b*, and *rpl1-2*; see Fig. 5B) in wild-type and *mmi1-ts3* strains at the permissive (25°C) and non-permissive (37°C) temperatures. The *spo5* meiotic gene was analyzed as a positive control for Mmi1-dependent regulation. *rpl30-2* could not be analyzed as its expression is heat sensitive (see Fig. 4). mRNA levels are relative to the wild-type strain and normalized to the *srp7* RNA. The data and error bars represent the average and standard deviation from at least three independent experiments.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S 1, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in spliced and unspliced mRNA in *pab2*-null cells as determined by the transread/exon-intron read analysis.

Section 1

gene	wt.tr	wt.in	pab2.tr	pab2.in	wt.exon.signal	wt.intron.signal	pab2.exon.signal	pab2.intron.signal
SPAC13G6.12c	3.00	1.00	15.00	3.50	3.13	1.38	7.63	6.96
SPAC31A2.14	13.00	0.00	25.00	1.00	36.46	1.26	37.27	2.54
SPAC24H6.09	166.00	5.50	254.00	13.00	42.96	15.68	45.06	28.74
SPAC13A11.03	3.00	0.50	26.00	2.00	14.06	0.34	64.64	3.13
SPAC16C9.04c	126.00	0.50	206.00	1.00	84.79	4.89	96.28	4.00
SPAC222.15	1.00	0.25	12.75	0.75	1.78	0.46	14.69	2.45
SPAC23C4.15	121.00	0.75	212.50	1.75	139.00	4.86	136.19	5.51
SPAC56F8.11	18.50	0.50	49.00	2.75	74.43	2.39	69.01	4.07
SPAC56E4.04c	42.00	0.50	97.00	1.00	287.00	2.02	294.98	1.02
SPAPB17E12.09	1.00	0.00	5.00	0.50	0.49	0.69	1.80	0.70
SPAP27G11.08c	0.00	0.50	9.00	2.50	0.79	1.27	6.55	4.50
SPAC343.07	0.00	0.00	0.33	0.17	0.11	0.00	1.33	0.69
SPAC664.08c	10.00	0.00	28.67	0.17	44.08	1.07	70.35	1.94
SPAC1610.03c	0.00	0.00	0.33	0.17	0.37	0.00	1.10	0.13
SPAC13G7.01c	72.67	1.17	114.00	1.83	73.19	13.79	71.82	19.28
SPAC6B12.10c	132.00	2.50	224.00	5.00	41.44	12.70	40.82	20.60
SPAC31G5.05c	107.00	0.50	192.00	2.00	288.60	35.91	270.19	44.09
SPAC3G9.05	24.00	0.00	38.50	0.50	48.96	11.03	63.17	9.20
SPAC6G9.13c	3.00	1.00	58.00	9.00	6.30	1.30	62.50	5.90
SPAC16E8.16	60.00	16.00	180.00	158.00	31.90	19.95	143.51	114.25
SPAC17A2.13c	658.00	4.00	1134.00	9.00	786.30	22.28	811.45	27.57
SPAC2F3.13c	112.00	0.50	219.00	2.50	78.99	19.77	100.15	29.52
SPAC19G12.07c	41.67	0.67	142.67	1.08	60.56	5.97	171.44	8.75
SPAC1250.05	191.00	21.00	519.00	219.50	484.00	14.95	1491.82	94.35
SPAC14C4.03	0.50	0.25	7.00	1.00	1.48	0.36	14.51	3.58
SPBC1198.10c	30.00	1.00	20.00	2.00	18.89	1.34	19.81	2.48
SPBC660.17c	22317.00	7.50	34067.00	14.50	42.66	2.36	38.51	3.75
SPBC106.18	12.00	0.25	20.00	0.50	7.64	3.52	7.57	2.96
SPBC947.12	3.00	0.00	8.00	0.50	4.47	0.00	15.39	0.48
SPBPJ4664.03	2.00	0.30	12.80	0.80	1.78	0.72	8.09	1.77
SPBC119.14	1.50	0.00	18.00	0.25	2.09	0.00	17.87	2.23
SPBC646.17c	60.00	10.50	107.00	19.00	121.30	12.97	205.40	27.81
SPBC1709.10c	65.00	2.00	185.00	4.00	29.34	4.04	27.81	4.54

Table S 1, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in spliced and unspliced mRNA in pab2-null cells as determined by the transread/exon-intron read analysis.

Section 1 suite

<i>gene</i>	<i>ratio.tr</i>	<i>ratio.int</i>	<i>ratio.exon.signal</i>	<i>ratio.intron.signal</i>
SPAC13G6.12c	5,00	3,50	2,44	5,05
SPAC31A2.14	1,92	Inf	1,02	2,02
SPAC24H6.09	1,53	2,36	1,05	1,83
SPAC13A11.03	8,67	4,00	4,60	9,09
SPAC16C9.04c	1,63	2,00	1,14	0,82
SPAC222.15	12,75	3,00	8,25	5,30
SPAC23C4.15	1,76	2,33	0,98	1,13
SPAC56F8.11	2,65	5,50	0,93	1,70
SPAC56E4.04c	2,31	2,00	1,03	0,51
SPAPB17E12.09	5,00	Inf	3,70	1,01
SPAP27G11.08c	Inf	5,00	8,33	3,53
SPAC343.07	Inf	Inf	12,29	Inf
SPAC664.08c	2,87	Inf	1,60	1,82
SPAC1610.03c	Inf	Inf	2,95	Inf
SPAC13G7.01c	1,57	1,57	0,98	1,40
SPAC6B12.10c	1,70	2,00	0,99	1,62
SPAC31G5.05c	1,79	4,00	0,94	1,23
SPAC3G9.05	1,60	Inf	1,29	0,83
SPAC6G9.13c	19,33	9,00	9,91	4,54
SPAC16E8.16	3,00	9,88	4,50	5,73
SPAC17A2.13c	1,72	2,25	1,03	1,24
SPAC2F3.13c	1,96	5,00	1,27	1,49
SPAC19G12.07c	3,42	1,63	2,83	1,47
SPAC1250.05	2,72	10,45	3,08	6,31
SPAC14C4.03	14,00	4,00	9,78	10,10
SPBC1198.10c	1,67	2,00	1,05	1,85
SPBC660.17c	1,63	2,00	0,90	1,59
SPBC106.18	1,53	1,93	1,41	1,92
SPBC947.12	1,67	2,00	0,99	0,84
SPBPJ4664.03	2,67	Inf	3,45	Inf
SPBC119.14	6,40	2,67	4,55	2,47
SPBC646.17c	12,00	Inf	8,57	Inf
SPBC1709.10c	1,78	1,81	1,69	2,14
SPBC4.04c	2,85	2,00	0,95	1,12

Table S 1, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in spliced and unspliced mRNA in *pab2*-null cells as determined by the transread/exon-intron read analysis.

Section 2

gene	wt.lr	wt.int	pab2.lr	pab2.int	wt.exon.signal	wt.intron.signal	pab2.exon.signal	pab2.intron.signal
SPBC651.01c	69.67	0.50	107.33	1.50	202.40	16.19	330.21	18.34
SPBC83.02c	4100.00	4.50	6161.00	7.00	2862.00	582.30	3737.31	330.09
SPBC83.09c	29.00	0.00	54.00	0.50	15.05	6.21	21.06	7.66
SPBC19C2.08	48.00	1.00	77.00	2.50	42.30	1.16	50.43	2.34
SPBC18H10.02	34.00	4.00	62.00	8.00	270.90	4.40	346.61	7.05
SPBC3H7.06c	6.00	0.00	21.00	0.50	11.29	1.84	21.57	2.79
SPBC1A4.07c	121.00	0.00	206.00	0.50	52.86	6.28	70.55	21.90
SPBC6B1.03c	0.00	0.00	0.50	0.25	0.53	0.00	0.78	0.60
SPBP4H10.04	55.00	0.50	94.00	2.25	66.49	12.12	54.25	9.10
SPBC4C3.06	27.00	0.00	50.00	1.00	57.65	14.62	49.78	12.44
SPBC3B9.11c	28.50	0.25	52.00	0.75	75.80	15.95	78.91	14.10
SPBC3B9.15c	28.00	0.00	48.00	0.50	34.73	0.56	32.77	0.57
SPBC1347.12	0.33	0.50	4.67	1.50	4.36	1.05	14.75	2.55
SPBPB2B2.18	0.33	0.17	4.67	1.00	0.43	0.51	3.69	1.75
SPCC962.01	3.00	0.00	6.00	0.50	71.34	1.09	65.31	0.92
SPCC1672.07	38.00	0.00	59.00	0.50	49.17	1.09	61.62	0.55
SPCC5E4.10c	23.00	0.50	51.00	1.50	20.55	2.40	33.10	5.81
SPCC63.08c	7.00	0.00	12.00	0.50	24.77	3.62	25.60	9.40
SPCC16A11.03c	53.00	6.00	84.00	9.50	34.18	2.88	31.06	2.59
SPCC1442.02	11.00	0.00	19.00	1.00	11.56	1.12	14.92	4.53
SPCC1442.04c	3.00	0.00	54.00	0.50	65.07	355.80	462.74	3660.20
SPCC18.05c	86.00	0.33	146.67	0.83	63.93	5.65	106.13	9.58
SPCC1494.04c	64.00	0.00	141.00	1.50	35.83	2.95	45.42	4.30
SPCC1827.05c	108.00	0.00	219.00	0.50	121.60	23.36	161.38	35.39

Table S 1, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in spliced and unspliced mRNA in *pab2*-null cells as determined by the transread/exon-intron read analysis.

Section 2 suite

<i>gene</i>	<i>ratio.tr</i>	<i>ratio.int</i>	<i>ratio.exon.signal</i>	<i>ratio.intron.signal</i>
SPBC651.01c	1,54	3,00	1,63	1,13
SPBC83.02c	1,50	1,56	1,31	0,57
SPBC83.09c	1,86	Inf	1,40	1,23
SPBC19C2.08	1,60	2,50	1,19	2,02
SPBC18H10.02	1,82	2,00	1,28	1,60
SPBC3H7.06c	3,50	Inf	1,91	1,51
SPBC1A4.07c	1,70	Inf	1,33	3,49
SPBC6B1.03c	Inf	Inf	1,48	Inf
SPBP4H10.04	1,71	4,50	0,82	0,75
SPBC4C3.06	1,85	Inf	0,86	0,85
SPBC3B9.11c	1,82	3,00	1,04	0,88
SPBC3B9.15c	1,71	Inf	0,94	1,01
SPBC1347.12	14,00	3,00	3,39	2,42
SPBPB2B2.18	14,00	6,00	8,59	3,41
SPCC962.01	2,00	Inf	0,92	0,84
SPCC1672.07	1,55	Inf	1,25	0,51
SPCC5E4.10c	2,22	3,00	1,61	2,42
SPCC63.08c	1,71	Inf	1,03	2,60
SPCC16A11.03c	1,58	1,58	0,91	0,90
SPCC1442.02	1,73	Inf	1,29	4,04
SPCC1442.04c	18,00	Inf	7,11	10,29
SPCC18.05c	1,71	2,50	1,66	1,70
SPCC1494.04c	2,20	Inf	1,27	1,46
SPCC1827.05c	2,03	Inf	1,33	1,52

Table S 2, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in total and unspliced mRNA in pab2-null cells as determined by the exon/intron signal analysis.

Section 1

gene	wt.tr	wt.int	pab2.ir	pab2.int	wt.exon.signal	wt.intron.signal	pab2.exon.signal	pab2.intron.signal
SPAC13G6.12c	3.00	1.00	15.00	3.50	3.13	1.38	7.63	6.96
SPAC13A11.03	3.00	0.50	26.00	2.00	14.06	0.34	64.64	3.13
SPAC22F3.04	0.00	0.00	2.20	0.00	0.10	0.15	0.44	0.30
SPAC22F3.03c	5.07	0.54	13.43	0.29	6.36	1.89	13.12	3.70
SPAC16B7.11	82.33	0.17	160.67	0.00	101.80	2.58	186.60	4.52
SPAC222.15	1.00	0.25	12.75	0.75	1.78	0.46	14.69	2.45
SPAP27G11.08c	0.00	0.50	9.00	2.50	0.79	1.27	6.55	4.50
SPAC343.07	0.00	0.00	0.33	0.17	0.11	0.00	1.33	0.69
SPAC664.08c	10.00	0.00	28.67	0.17	44.08	1.07	70.35	1.94
SPAC1610.03c	0.00	0.00	0.33	0.17	0.37	0.00	1.10	0.13
SPAC4G9.05	3.00	0.00	4.50	0.00	0.85	0.00	1.97	2.00
SPAC6B12.16	0.00	0.00	13.00	0.00	0.13	0.00	3.71	0.62
SPAC8F11.02c	429.00	3.75	673.00	0.50	302.70	32.46	465.46	49.03
SPAC513.03	0.00	0.00	3.00	0.00	2.94	0.00	20.80	2.28
SPAC6G9.13c	3.00	1.00	58.00	9.00	6.30	1.30	62.50	5.90
SPAC16E8.16	60.00	16.00	180.00	158.00	31.90	19.95	143.51	114.25
SPAC1556.06.1	0.00	0.00	29.00	0.00	5.03	18.53	28.91	49.03
SPAC1556.06.2	0.00	16.50	0.00	42.00	5.41	18.53	41.11	49.03
SPAC19G12.08	349.00	1.50	876.00	1.50	165.30	1.71	293.57	3.57
SPAC22F8.09	124.00	0.50	330.00	0.00	86.02	12.19	133.97	19.35
SPAC20G4.09	0.00	0.00	0.00	1.00	0.44	0.00	4.01	1.42
SPAPB8E5.05	0.00	0.00	0.00	0.50	0.51	0.00	1.04	0.46
SPAC1006.03c	7.67	3.83	10.67	6.83	41.98	3.49	93.00	5.64
SPAC1250.05	191.00	21.00	519.00	219.50	484.00	14.95	1491.82	94.35
SPAC1250.02	0.00	0.00	0.00	2.50	0.68	0.00	2.74	2.69
SPAC26F1.12c	157.50	2.25	356.50	2.50	96.97	44.24	162.17	97.11
SPAC14C4.03	0.50	0.25	7.00	1.00	1.48	0.36	14.51	3.59
SPBC428.07	4.50	0.00	6.00	0.00	3.64	0.00	14.82	0.26
SPBPJ4664.03	3.00	0.00	8.00	0.50	4.47	0.00	15.39	0.48
SPBC119.14	2.00	0.30	12.80	0.80	1.78	0.72	8.09	1.77
SPBC577.05c	0.00	0.00	0.50	0.00	0.82	0.00	2.23	0.43
SPBC646.17c	1.50	0.00	18.00	0.25	2.09	0.00	17.87	2.23
SPBC1709.10c	60.00	10.50	107.00	19.00	121.30	12.97	205.40	27.81
SPBC4.01	0.00	1.50	0.00	4.50	1.06	3.03	3.62	8.30

Table S 2, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in total and unspliced mRNA in pab2-null cells as determined by the exon/intron signal analysis.

Section 1 suite

gene	ratio.tr	ratio.int	ratio.exon.signal	ratio.intron.signal
SPAC13G6.12c	5,00	3,50	2,44	5,05
SPAC13A11.03	8,67	4,00	4,60	9,09
SPAC22F3.04	Inf	NA	4,43	2,02
SPAC22F3.03c	2,65	0,53	2,06	1,96
SPAC1687.11	1,95	0,00	1,83	1,75
SPAC222.15	12,75	3,00	8,25	5,30
SPAP27G11.08c	Inf	5,00	8,33	3,53
SPAC343.07	Inf	Inf	12,29	Inf
SPAC664.08c	2,87	Inf	1,60	1,82
SPAC1610.03c	Inf	Inf	2,95	Inf
SPAC4G9.05	1,50	NA	2,31	Inf
SPAC6B12.16	Inf	NA	29,04	Inf
SPAC8F11.02c	1,57	0,13	1,54	1,51
SPAC513.03	Inf	NA	7,07	Inf
SPAC6G9.13c	19,33	9,00	9,91	4,54
SPAC16E8.16	3,00	9,88	4,50	5,73
SPAC1556.06.1	Inf	NA	5,75	2,65
SPAC1556.06.2	NA	2,55	7,61	2,65
SPAC19G12.08	2,51	1,00	1,78	2,09
SPAC22F8.09	2,66	0,00	1,56	1,59
SPAC20G4.09	NA	Inf	9,09	Inf
SPAPB8E5.05	NA	Inf	2,02	Inf
SPAC1006.03c	1,39	1,78	2,22	1,62
SPAC1250.05	2,72	10,45	3,08	6,31
SPAC1250.02	NA	Inf	4,04	Inf
SPAC26F1.12c	2,26	1,11	1,67	2,20
SPAC14C4.03	14,00	4,00	9,78	10,10
SPBC428.07	1,33	NA	4,07	Inf
SPBPJ4664.03	2,67	Inf	3,45	Inf
SPBC119.14	6,40	2,67	4,55	2,47
SPBC577.05c	Inf	NA	2,73	Inf
SPBC646.17c	12,00	Inf	8,57	Inf
SPBC1709.10c	1,78	1,81	1,69	2,14
SPBC4.01	NA	3,00	3,41	2,74

Table S 2, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in total and unspliced mRNA in pab2-null cells as determined by the exon/intron signal analysis.

Section 2

gene	wt.tr	wt.int	pab2.tr	pab2.int	wt.exon.signal	wt.intron.signal	pab2.exon.signal	pab2.intron.signal
SPBC3D6.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.56
SPBC3H7.06c	6.00	0.00	21.00	0.50	11.29	1.84	21.57	2.79
SPBC16E9.10c	40.67	0.17	71.33	0.00	20.59	4.70	34.30	8.90
SPBC16E9.17c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.30	0.38
SPBC29A3.07c	29.00	0.50	45.00	0.50	38.47	1.39	64.43	2.11
SPBC18E5.15	0.00	11.00	0.00	19.50	6.16	12.69	9.85	21.73
SPBC1711.14	1.00	0.00	3.00	0.00	0.55	0.00	2.34	0.66
SPBC557.05	2.50	0.00	9.50	0.00	4.42	0.37	12.53	1.13
SPBC29A10.02	0.50	0.00	14.50	0.00	1.59	0.31	18.28	0.62
SPBC336.02	79.00	1.00	315.00	0.50	47.14	6.07	105.92	28.41
SPBC30D10.18c	49.00	95.50	56.00	135.00	331.30	168.50	799.31	322.44
SPBC2G2.09c	1.67	1.00	13.00	1.33	1.69	1.07	9.44	2.30
SPBP8B7.04	2.00	0.00	3.00	2.50	3.32	0.75	17.53	5.32
SPBP8B7.16c	167.00	8.75	906.00	8.75	184.30	37.98	756.94	74.26
SPBC1347.12	0.33	0.50	4.67	1.50	4.36	1.05	14.75	2.55
SPBC16C6.10	37.00	6.50	111.00	9.50	16.62	24.61	27.99	46.28
SPBPB2B2.18	0.33	0.17	4.67	1.00	0.43	0.51	3.69	1.75
SPCC31H12.05c	26.67	4.67	52.33	6.83	36.61	5.94	70.30	10.68
SPCC5E4.10c	23.00	0.50	51.00	1.50	20.55	2.40	33.10	5.81
SPCPJ732.03	0.50	0.00	1.50	0.00	0.15	0.00	0.59	0.33
SPCC4E9.01c	0.88	0.13	11.75	0.06	1.50	0.21	10.52	0.35
SPCC1442.04c	3.00	0.00	54.00	0.50	65.07	355.80	462.74	3660.20
SPCC297.04c	16.00	9.00	24.00	45.00	29.00	3.47	51.80	12.10
SPCC18.05c	86.00	0.33	146.67	0.83	63.93	5.65	106.13	9.58
SPCC70.04c	3.00	0.50	4.50	0.75	1.26	0.61	2.00	1.24

Table S 2, related to Figure 5. List of genes that show >1.5-fold increase in total and unspliced mRNA in *pab2*-null cells as determined by the exon/intron signal analysis.

Section 2 suite

gene	ratio.tr	ratio.int	ratio.exon.signal	ratio.intron.signal
SPBC3D6.16	NA	NA	Inf	Inf
SPBC3H7.06c	3,50	Inf	1,91	1,51
SPBC16E9.10c	1,75	0,00	1,67	1,89
SPBC16E9.17c	NA	NA	11,11	Inf
SPBC29A3.07c	1,55	1,00	1,67	1,52
SPBC18E5.15	NA	1,77	1,60	1,71
SPBC1711.14	3,00	NA	4,26	Inf
SPBC557.05	3,80	NA	2,83	3,03
SPBC29A10.02	29,00	NA	11,48	2,02
SPBC336.02	3,99	0,50	2,25	4,68
SPBC30D10.18c	1,35	1,41	2,41	1,91
SPBC2G2.09c	7,80	1,33	5,59	2,15
SPBP8B7.04	1,50	Inf	5,27	7,07
SPBP8B7.16c	5,43	1,00	4,11	1,96
SPBC1347.12	14,00	3,00	3,39	2,42
SPBC16C6.10	3,00	1,46	1,68	1,88
SPBPB2B2.18	14,00	6,00	8,59	3,41
SPCC31H12.05c	1,96	1,46	1,92	1,80
SPCC5E4.10c	2,22	3,00	1,61	2,42
SPCPJ732.03	3,00	NA	4,04	Inf
SPCC4E9.01c	13,43	0,50	6,99	1,68
SPCC1442.04c	18,00	Inf	7,11	10,29
SPCC297.04c	1,50	5,00	1,79	3,49
SPCC18.05c	1,71	2,50	1,66	1,70
SPCC70.04c	1,50	1,50	1,59	2,02

Table S 3, related to Figure 5. List of overlapping genes from the lists of genes that showed increased levels of spliced and unspliced mRNA using the transreads/exon-intron reads analysis (Table S1) and the exon/intron signals analysis (Table S2).

gene	wt.tr	wt.int	pab2.tr	pab2.int	wt.exon.signal	wt.intron.signal	pab2.exon.signal	pab2.intron.signal
SPAC13G6.12c	3.00	1.00	15.00	3.50	3.13	1.38	7.63	6.96
SPAC13A11.03	3.00	0.50	26.00	2.00	14.06	0.34	64.64	3.13
SPAC222.15	1.00	0.25	12.75	0.75	1.78	0.46	14.69	2.45
SPAP27G11.08c	0.00	0.50	9.00	2.50	0.79	1.27	6.55	4.50
SPAC343.07	0.00	0.00	0.33	0.17	0.11	0.00	1.33	0.69
SPAC664.08c	10.00	0.00	28.67	0.17	44.08	1.07	70.35	1.94
SPAC1610.03c	0.00	0.00	0.33	0.17	0.37	0.00	1.10	0.13
SPAC6G9.13c	3.00	1.00	58.00	9.00	6.30	1.30	62.50	5.90
SPAC16E8.16	60.00	16.00	180.00	158.00	31.90	19.95	143.51	114.25
SPAC1250.05	191.00	21.00	519.00	219.50	484.00	14.95	1491.82	94.35
SPAC14C4.03	0.50	0.25	7.00	1.00	1.48	0.36	14.51	3.59
SPBPJ4664.03	3.00	0.00	8.00	0.50	4.47	0.00	15.39	0.48
SPBC119.14	2.00	0.30	12.80	0.80	1.78	0.72	8.09	1.77
SPBC646.17c	1.50	0.00	18.00	0.25	2.09	0.00	17.87	2.23
SPBC1709.10c	60.00	10.50	107.00	19.00	121.30	12.97	205.40	27.81
SPBC3H7.06c	6.00	0.00	21.00	0.50	11.29	1.84	21.57	2.79
SPBC1347.12	0.33	0.50	4.67	1.50	4.36	1.05	14.75	2.55
SPBPB2B2.18	0.33	0.17	4.67	1.00	0.43	0.51	3.69	1.75
SPCC5E4.10c	23.00	0.50	51.00	1.50	20.55	2.40	33.10	5.81
SPCC1442.04c	3.00	0.00	54.00	0.50	65.07	355.80	462.74	3660.20
SPCC18.05c	86.00	0.33	146.67	0.83	63.93	5.65	106.13	9.58

Table S 3, related to Figure 5. List of overlapping genes from the lists of genes that showed increased levels of spliced and unspliced mRNA using the transreads/exon-intron reads analysis (Table S1) and the exon/intron signals analysis (Table S2).

Suite

<i>gene</i>	<i>ratio.tr</i>	<i>ratio.int</i>	<i>ratio.exon.signal</i>	<i>ratio.intron.signal</i>
SPAC13G6.12c	5,00	3,50	2,44	5,05
SPAC13A11.03	8,67	4,00	4,60	9,09
SPAC222.15	12,75	3,00	8,25	5,30
SPAP27G11.08c	Inf	5,00	8,33	3,53
SPAC343.07	Inf	Inf	12,29	Inf
SPAC664.08c	2,87	Inf	1,60	1,82
SPAC1610.03c	Inf	Inf	2,95	Inf
SPAC6G9.13c	19,33	9,00	9,91	4,54
SPAC16E8.16	3,00	9,88	4,50	5,73
SPAC1250.05	2,72	10,45	3,08	6,31
SPAC14C4.03	14,00	4,00	9,78	10,10
SPBPJ4664.03	2,67	Inf	3,45	Inf
SPBC119.14	6,40	2,67	4,55	2,47
SPBC646.17c	12,00	Inf	8,57	Inf
SPBC1709.10c	1,78	1,81	1,69	2,14
SPBC3H7.06c	3,50	Inf	1,91	1,51
SPBC1347.12	14,00	3,00	3,39	2,42
SPBPB2B2.18	14,00	6,00	8,59	3,41
SPCC5E4.10c	2,22	3,00	1,61	2,42
SPCC1442.04c	18,00	Inf	7,11	10,29
SPCC18.05c	1,71	2,50	1,66	1,70

Table S 4. List of *S. pombe* strains used in this study

Strain	Genotype
FBY106	h+ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3D1
FBY107	h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::kanMX6
FBY176	h+ leu1 ura4 his2 dis3-54
FBY193	h+ leu1 ura4 his2 dis3-54 pab2::ura4
FBY195	h- ade6-704 ura4- leu1-32 rrp6::kanMX6
FBY229	h? ade6M? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 ccr4::ura4
FBY231	h? ade6M? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 ccr4::ura4 pab2::kanMX6
FBY233	h- ade6-704 ura4- leu1-32 rrp6::kanMX6 pab2::ura4
FBY245	h- ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 cid14::ura4
FBY250	h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 cid14::ura4 pab2::kanMX6
FBY252	h+ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 ski7::ura4
FBY253	h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 ski7::ura4 pab2::kanMX6
FBY266	h- ade6-M375
FBY374	h- ade6M? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY403	h- ade6-M375 pab2::kanMX6
FBY406	h- ade6-M375 upf2::kanMX6
FBY462	h+ ade6::pBPade6-Pab2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::kanMX6
FBY467	h+ ade6::pBPade6-Pab2-F75R leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::kanMX6
FBY473	h+ ade6::pBPade6-Pab2-R-to-A leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::kanMX6
FBY477	h? ade6M? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pan2::ura4 pab2::kanMX6
FBY479	h? ade6M? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pan2::ura4
FBY498	h- mmi1-ts3::kanR ade6-M216 leu1
FBY525	h+ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 parn::ura4
FBY526	h+ ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 parn::ura4 pab2::kanMX6
FBY590	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY591	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4
FBY592	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2-Rbz leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY593	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2-Rbz leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4
FBY596	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2Δi leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY597	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2Δi leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4
FBY657	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rrp6::ura4
FBY659	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2-Rbz leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rrp6::ura4
FBY661	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2Δi leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rrp6::ura4
FBY684	h+ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-1::kanMX6
FBY686	h+ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-1::kanMX6 pab2::ura4
FBY815	h+ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::kanMX6

FBY820	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron rps3 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY821	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron rps3 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura
FBY822	h? ade6::pFBade6-Rad24 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rad24::kanMX6
FBY824	h? ade6::pFBade6-Rad24-intron rpl30-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rad24::kanMX6
FBY961	h? ade6? leu1-32 ura4-D18 his3-D1
FBY962	h? ade6? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 pab2::ura4
FBY963	h? ade6? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 p81nmt1::kanMX6-mtr4
FBY964	h? ade6? leu1-32 ura4-D18 his3-D1 p81nmt1::kanMX6-mtr4 pab2::ura4
FBY1035	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rpl30-1::ura4
FBY1036	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2 Δ i leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rpl30-1::ura4
FBY1038	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron rps3 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 rpl30-1::ura4
FBY1077	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2-Termi snu2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY1078	h- ade6::pBPade6-Rpl30-2-Termi snu2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4
FBY1082	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron dbp2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY1083	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron dbp2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4
FBY1084	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron rpl1-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6
FBY1085	h- ade6::pFBade6-Rpl30-2-intron rpl1-2 leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rpl30-2::kanMX6 pab2::ura4

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains, Media, and Growth conditions. Cells were transformed with linearized plasmids and PCR products by the lithium acetate method. All gene disruptions were performed by PCR-mediated gene targeting (Bähler et al., 1998) using 100-nt oligonucleotides with 80-nt from the appropriate regions of the genomic sequences to be targeted. The oligonucleotide sequences used for the construction of these strains are available upon request. All gene knockouts were confirmed by RT-PCR.

DNA Constructs. To generate the *rpl30-2* construct, the DNA encoding *rpl30-2* with 1-kb promoter and 1-kb terminator sequences was amplified by PCR from genomic DNA using oligonucleotide sequences containing *ApaI* and *SpeI* restriction sites. The resulting PCR product was then cloned into pFB366 (Beaudoin and Labbé, 2006) that was previously digested with *ApaI* and *SpeI* to create plasmid pFB404. To generate the intronless version of *rpl30-2*, the *rpl30-2* cDNA was PCR-amplified and cloned into pFB366 in which 1-kb of *rpl30-2* promoter sequence was previously cloned using *ApaI* and *PstI* restriction sites, thus creating pFB412. pFB412 was then digested with *SpeI* and *SstI* to clone the *rpl30-2* terminator (1kb) and generate plasmid pFB413. The *rpl30-2*-ribozyme construct was generated by inserting a variant of the hepatitis δ ribozyme 2-nt upstream of the normal *rpl30-2* polyadenylation site. The ribozyme sequence used was previously described (Bird et al., 2005) and cloned into pFB366 to generate pFB405. The DNA encoding the *rpl30-2* gene plus 1-kb of promoter sequence was PCR-amplified using genomic DNA and cloned into pFB405 to generate pFB406.

The Pab2 expression construct was generated by PCR amplification of *pab2* cDNA and ligated into *PstI*- and *NotI*-digested pFB366. The *pab2* promoter (400 bp) was amplified by PCR from genomic DNA using oligonucleotide sequences containing *ApaI* and *PstI* sites and cloned upstream of *pab2* cDNA to create pFB372. pFB372 was digested with *SstI* to insert 1-kb of *pab2* terminator sequence to generate pFB373. Pab2 F75R was generated by site-directed mutagenesis using pFB373. Construction of the arginine-to alanine (R-to-A) allele of *pab2* were carried out by simultaneous site-directed mutagenesis

of Arg₁₃₉, Arg₁₄₁, Arg₁₄₃, Arg₁₄₅, Arg₁₄₇, Arg₁₄₉, Arg₁₅₁, Arg₁₅₃, Arg₁₅₇, Arg₁₅₉ and Arg₁₆₁ using a 158-nt complementary oligonucleotide that changed these arginine codons to alanine.

The Rpl30-1 expression construct was generated by PCR amplification of the *rpl30-1* coding region from genomic DNA using oligonucleotides containing XhoI and BamHI restriction sites. The resulting PCR product was then cloned into thiamine-sensitive vector, pREP3X (Forsburg, 1993), that was previously digested with XhoI and BamHI to create plasmid pFB500.

All pFB366-related constructs with *rpl30-2* and *pab2* derivatives were transformed into *rpl30-2Δ* and *pab2Δ* strains, respectively, using linearized DNA for single chromosomal integration at the *ade6* locus.

Antibodies. A rabbit polyclonal antibody specific to fission yeast Pab2 was raised at Pocono rabbit farm and laboratory Inc. (Canadensis, PA) using a GST-Pab2 fusion protein that was purified from *Escherichia coli*. The rabbit polyclonal antibody specific to *S. pombe* Rmt3 was previously described (Perreault et al., 2007).

Poly(A) pull-down assays. Poly(A) pull-down assays were as previously described (Perreault et al., 2007) with some modifications. 500 ug of total cell extracts were incubated for 2 h at 4°C with 15 ul of poly(A)-Sepharose 4B. The beads were then washed four time and the bound proteins were eluted by incubating for 5 min at 95°C in SDS-PAGE sample buffer. Eluted proteins were separated on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and analyzed by immunoblotting. Linear detection of Pab2 was performed and quantified using an Odyssey infrared imaging system (LI-COR). The percentage Pab2 binding to poly(A) for the different Pab2 variants was established as follows: signal ratio of copurified Pab2 over input. The corresponding values from this calculation were normalized to wild-type Pab2, which was arbitrarily set to 100%.

RNA-seq library preparation and analysis. Total RNA from *pab2Δ* and wild-type parental strains was isolated by the hot-phenol technique and RNA quality was assessed on an Agilent Bioanalyzer. 10μg total RNA was used as starting material for strand-specific RNA-seq library preparation using an unreleased early version provided by Illumina of the Illumina TruSeq Small RNA Sample Prep Kit. Briefly: poly(A)⁺ RNA was enriched by two rounds of poly(dT) Sera-Mag magnetic beads purification. Enriched poly(A)⁺ RNA was then fragmented to an average size of ~200nt. Fragmented RNA was 3' dephosphorylated with Antarctic phosphatase and 5' phosphorylated with polynucleotide kinase this treatment prepares RNA fragments for subsequent ligation of Illumina RNA adaptors to their 5' and 3' ends using a 3' RNA ligase and a T4 RNA ligase, respectively. First strand cDNA was produced using a primer specific for the Illumina 3' adaptor. The library was finally amplified with 15 cycles of PCR using primers specific for the Illumina adaptors and purified using SPRI-beads (Agencourt, Beckman Coulter). Libraries size distributions and concentrations were determined on an Agilent Bioanalyzer, RNA-seq libraries were sequenced on an Illumina Genome Analyzer IIx instrument generating 33016900 (54nt) and 30215747 (51nt) mappable single-end reads for the *pab2Δ* and wild-type control strains, respectively. Reads were first aligned to the fission yeast genome (Wood et al., 2002) with the exonerate software (Slater and Birney, 2005) and reads with up to 5 mismatches (not clustered at reads ends) were kept for further analysis ("Genomic set"). Remaining sequencing reads were then mapped against fission yeast spliced CDSs (Wood et al., 2002) and filtered as above ("Spliced set"). Both sets of reads were pooled and used for visualisation of the data. In order to detect accumulation of pre-mRNA in the *pab2Δ* strain, 4 numeric values were calculated from the RNA-seq data: (i) the number of "exon-exon transreads" was calculated for each gene in each condition as the number of reads from the "Spliced set" spanning exon-exon junctions; (ii) the number of "exon-intron reads" was calculated for each gene in each condition as the number of reads from the "Genomic set" spanning exon-intron junctions; the "exon-intron reads" which also mapped to the fission yeast spliced CDSs (obtained from GeneDB) were considered ambiguous and discarded; (iii) the "exon signal" was defined for each condition as the total expression score in RPKM of each gene exons; (iv) the "intron signal" was defined for each condition as the total expression score in RPKM of each gene introns. We combined two approaches

in order to detect genes that showed upregulation of mRNA and pre-mRNA in the *pab2Δ* strain using RNA-seq data: (i) for each gene, the ratio of “exon-exon transreads” in *pab2Δ* and control cells was compared to the ratio “exon-intron reads” in *pab2Δ* and control cells (Figure S4A). This comparison is equivalent to comparing levels of mature mRNA to levels of pre-mRNA. Based on the distribution of those 2 values an arbitrary cut off of 1.5 was used (genes with a value of zero in the control cells and greater than zero in *pab2Δ* cells were considered to be above cut off). Genes with values above cut off for both ratios were retained; (ii) for each gene, the ratio of “exon signals” in *pab2Δ* and control cells was compared to the ratio “intron signals” in *pab2Δ* and control cells (Figure S4B). This comparison is equivalent to comparing levels of total mRNA to levels of pre-mRNA. Based on the distribution of those 2 values an arbitrary cut off of 1.5 was used. Genes with values above cut off for both ratios were retained (genes with a value of zero in the control cells and greater than zero in *pab2Δ* cells were considered to be above cut off). We finally defined a high confidence list of genes subjected to control by Pab2-dependent pre-mRNA decay as the overlap of the two lists described above.

In order to score how efficiently individual transcripts were spliced the percentage of spliced transcripts was defined for each gene as: $(\text{number of exon-exon transreads}) / ((\text{number of exon-exon transreads}) + (\text{number of exon-intron reads})) \times 100$. The significance of the difference between scores from genes in the high confidence list and all other genes was assessed using a Wilcoxon rank sum test.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943-951.

Beaudoin, J., and Labbé, S. (2006). Copper induces cytoplasmic retention of fission yeast transcription factor *cu1*. *Eukaryot Cell* *5*, 277-292.

Bird, G., Fong, N., Gatlin, J. C., Farabaugh, S., and Bentley, D. L. (2005). Ribozyme cleavage reveals connections between mRNA release from the site of transcription and pre-mRNA processing. *Mol Cell* *20*, 747-758.

Forsburg, S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* *21*, 2955-2956.

Perreault, A., Lemieux, C., and Bachand, F. (2007). Regulation of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Arginine Methylation in Fission Yeast. *J Biol Chem* *282*, 7552-7562.

Slater, G. S., and Birney, E. (2005). Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* *6*, 31.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871-880.

DISCUSSION

La majorité des résultats que j'ai générés durant mon doctorat ont été discutés dans les chapitres 1-3. Au cours des prochaines pages, je discuterai des résultats les plus importants, des interrogations qu'ils soulèvent et des perspectives de recherches qu'ils leur sont associés. La discussion sera appuyée sur des résultats non publiés, des analyses personnelles et sur la littérature.

L'importance de la méthylation des arginines

Les premiers travaux sur l'orthologue de PABPN1 chez *S. pombe* (Pab2) ont démontré que les arginines du domaine riche en arginine de Pab2 sont méthylées par Rmt1. Cette modification post-traductionnelle n'a aucune répercussion sur plusieurs caractéristiques de Pab2, telles que sa localisation nucléaire, son affinité aux séquences poly(A) et son contrôle de la taille des queues poly(A). Par contre, les niveaux d'oligomérisation de Pab2 sont nettement augmentés lorsque Pab2 n'est plus méthylée. Cette observation s'explique par le fait que le domaine C-terminal de Pab2 inclut la région riche en arginine et le domaine d'oligomérisation (KÜHN *et al.*, 2003). Par conséquent, l'ajout de groupement méthyle aux arginines perturbe l'oligomérisation de Pab2. La méthylation de Pab2 n'est pas si surprenante puisque la PABPN1 est elle aussi méthylée *in vitro* par PRMT1, PRMT3 et PRMT6 (SMITH *et al.*, 1999; FRONZ *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que la PABPC1 est spécifiquement méthylée par CARM1/PRMT4 à deux arginines (R⁴⁵⁵ et R⁴⁶⁰) (LEE et BEDFORD, 2002).

Cette modification post-traductionnelle n'est pas restreinte à ces *poly(A)-binding protein* puisque plusieurs facteurs associés à l'épissage, à l'export des ARNm et tout particulièrement ceux du clivage et de la polyadénylation sont méthylés au niveau des arginines (BOISVERT *et al.*, 2003; RYAN et BAUER, 2008; MARTIN *et al.*, 2010). Ainsi, les protéines liant l'ARN représentent plus de 60% des protéines méthylées asymétriquement au noyau (BEDFORD et RICHARD, 2005). Il est intéressant de noter que la méthylation des arginines se réalise fréquemment au motif de reconnaissance à l'ARN et l'inhibition de cette modification post-traductionnelle réduit la capacité de la protéine à lier

un ARNm cible (DENMAN, 2002; YU, 2011). Il est vrai que la méthylation de Pab2 et de PABPN1 a lieu dans un domaine impliqué pour la liaison à l'ARN, mais l'état de méthylation n'a aucun impact sur la capacité de ces protéines à lier une séquence poly(A) (Chapitre 1, Figure 5C; KÜHN *et al.*, 2003).

Le rôle de cette modification post-traductionnelle peut avoir plusieurs impacts sur la fonction cellulaire de ces protéines. Un des rôles pour la méthylation d'arginine est de réguler l'habilité de certaines protéines à être exportées au cytosol (SHEN *et al.*, 1998) ou à être importées au noyau (YU, 2011). Par contre, ce rôle attribué à la méthylation ne semble pas affecter Pab2 puisque sa localisation nucléaire n'est pas modifiée par son état de méthylation (Chapitre 1, Figure 4E).

D'un autre côté, la méthylation des arginines peut affecter positivement ou négativement les interactions protéine-protéine (BEDFORD et CLARKE, 2009). Les étapes de maturation de l'ARNm nécessitent plusieurs facteurs, mais des perturbations au niveau de l'état de méthylation peuvent se refléter par des interactions protéiques différentes qui pourraient modifier le sort du mRNP (YU, 2011). Par exemple, la méthylation de certaines protéines permet de faciliter le recrutement co-transcriptionnel de quelques facteurs requis pour l'épissage (CHEN *et al.*, 2010) et pour la maturation du pré-ARNm (YU *et al.*, 2004).

Ainsi, il est envisageable de penser que la méthylation de Pab2 serait requise pour favoriser diverses associations protéiques, telles que les facteurs impliqués pour l'épissage, le clivage ou la polyadénylation. Ce point pourrait être supporté par le fait que la protéine Pab2 est rapidement recrutée aux gènes activement transcrits (Chapitre 2, Figures 1 et 3) et qu'elle pourrait avoir la possibilité d'interagir avec une variété de facteurs impliqués dans la maturation du pré-ARNm. Par contre, l'absence de méthylation des arginines à Pab2 ne semble pas affecter le profil général de la polyadénylation (Chapitre 1, Figure 5D, lignes 1 et 5), mais cette expérience ne permet pas de déterminer si les transcrits sont toujours clivés au même endroit. Parallèlement à ce point, il serait pertinent de vérifier si la méthylation de Pab2 peut influencer le clivage et l'épissage de certains transcrits de même que leurs

exportations au cytosol. Afin de confirmer si la méthylation de Pab2 affecte diverses interactions protéiques, il suffirait de réaliser une purification TAP dans le contexte où Pab2 n'est pas méthylée et de comparer ces résultats avec ceux obtenus lorsque Pab2 est méthylée.

Le recrutement de Pab2 aux gènes activement transcrits

La plupart des facteurs impliqués dans la maturation du pré-ARNm sont recrutés à la région 3' d'un gène, notamment Pcf11, Rna14 et Rna15 (KIM *et al.*, 2004a). De façon surprenante, mes travaux ont permis de montrer par des essais d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) que Pab2 est recrutée aux gènes activement transcrits bien avant qu'un facteur spécifique pour le clivage et la polyadénylation y soit recruté.

Le fait d'observer le recrutement de Pab2 durant l'élongation de la transcription n'est pas une nouvelle observation puisqu'il a été répertorié que quelques facteurs impliqués dans le clivage et la polyadénylation (Hrp1, CPSF73, CstF64) sont eux aussi recrutés bien avant l'extrémité 3' du gène (KOMARNITSKY *et al.*, 2000; GLOVER-CUTTER *et al.*, 2008). Par contre, l'importance fonctionnelle de ce recrutement précoce demeure plus ou moins comprise, mais il peut être en partie expliqué par le fait que certains facteurs ont un rôle dans plus d'une étape de maturation du pré-ARNm.

Il est intéressant de mentionner que plusieurs études indiquent qu'un certain nombre de protéines importantes pour l'exportation efficace des ARNm sont recrutées au cours de la transcription tant chez la levure à bourgeon (STRÄSSER *et al.*, 2002; ABRUZZI *et al.*, 2004) que les humains (MASUDA *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2006). Ainsi, l'absence d'une de ces protéines entraîne la rétention des ARNm au noyau. Il serait possible d'envisager que Pab2 pourrait être impliquée pour l'export des ARNs. Premièrement, le profil de recrutement de Pab2 aux gènes ressemble à celui observé pour les facteurs d'export. Dans un deuxième temps, l'analyse de la purification TAP de Pab2 a révélé que cette protéine interagit avec le facteur Nxt1 (Chapitre 2, Figure 5B), une protéine stimulant l'activité d'export d'ARNm de TAP (FRIBOURG *et al.*, 2001). Troisièmement, la délétion

de Pab2 se répercute par la rétention d'ARNs polyadénylés au nucléole (LEMAY *et al.*, 2010). Conformément à ces arguments, la déplétion cellulaire de *PABP2* chez la drosophile entraîne l'accumulation nucléaire des ARNs polyadénylés (FARNY *et al.*, 2008). Tous ces arguments peuvent soutenir un rôle possible de Pab2 pour l'export des ARNs au cytosol, toutefois il faudrait démontrer clairement ce rôle par des expériences supplémentaires. L'une d'entre elles serait de suivre l'export de différents ARNs. Il suffirait de choisir quelques ARNs et d'ajouter plusieurs tige-boucles spécifiques afin que la protéine MS2-GFP puisse s'y lier. Ainsi, la liaison de cette protéine aux tiges-boucles permettra de détecter cet ARN dans la cellule par microscopie épifluorescence ou par microscopie confocale (QUERIDO et CHARTRAND, 2008; MOR *et al.*, 2010). Afin de vérifier si Pab2 peut influencer l'export d'ARN, il faudrait vérifier l'efficacité d'export en présence et en absence de Pab2. L'efficacité pourrait être déterminée par le temps moyen nécessaire à exporter l'ARN au cytosol.

L'implication de Pab2 pour l'export des ARNm pourrait ressembler à celle de Pcf11. En effet, ce facteur participe directement à recruter co-transcriptionnellement le facteur Yra1, une composante requise pour le complexe TREX (JOHNSON *et al.*, 2009). Ainsi, il ne serait pas si surprenant que Pab2 facilite le recrutement de facteurs associés à l'export des ARNm. Par contre, l'expérience proposée ne permettra pas de discriminer entre un rôle direct ou indirect de Pab2 sur l'export des ARNs. Il peut être envisageable de penser que l'implication de Pab2 serait plutôt indirecte puisque la plupart des facteurs d'export sont encodés par des gènes essentiels et ce n'est pas le cas pour Pab2.

Régulation de l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2

Mes travaux ont permis de mettre en lumière un mécanisme de régulation permettant de contrôler l'expression génique de certains gènes. Ce mécanisme dépendant de Pab2 permet de dégrader spécifiquement certains pré-ARNm inefficacement épissés par la machinerie de dégradation nucléaire, notamment par Rrp6. Au cours de mes travaux, j'ai démontré que le paralogue Rpl30-1 régule l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2. Cet aspect tout à fait nouveau a permis de démontrer l'interrelation des protéines ribosomales,

toutefois le mécanisme d'action n'est pas clairement élucidé.

La réaction croisée entre les deux paralogues Rpl30-1 et Rpl30-2 est particulièrement intéressante par le fait qu'elle semble se réaliser uniquement dans un sens. La surexpression de Rpl30-1 entraîne une diminution de l'ARNm Rpl30-2 (Chapitre 3, Figure 6D), mais la surexpression de Rpl30-2 n'a aucun effet sur le transcrite Rpl30-1 (données non publiées). De plus, la surexpression de Rpl30-1 n'a aucun impact sur l'ARNm endogène de Rpl30-1 (données non publiées). Le fait que l'action de Rpl30-1 se réalise uniquement sur le transcrite Rpl30-2 suggère que la séquence et/ou la structure secondaire de l'ARN peuvent influencer cette association. Étant donné que la séquence du pré-ARNm Rpl30-2 est de 600 nt et que celle de Rpl30-1 est de 389 nt avec une homologie de 74%, il peut être ardu de trouver un élément de séquence pertinent. Malgré tout, il est possible de se référer au transcrite RPL30 chez *S. cerevisiae*. Tel que mentionné au chapitre 3, le transcrite RPL30 est auto-régulé par sa propre protéine L30 puisque ce gène n'est pas dupliqué (VILARDELL *et al.*, 2000a). Cette auto-régulation est relativement bien caractérisée tant par les séquences que par la structure protéique. Ainsi, il sera possible de transposer ces caractéristiques pour mieux comprendre le mécanisme observé chez *S. pombe*. D'autant plus que l'homologie de séquence en ARN pour RPL30 par rapport à Rpl30-1 et Rpl30-2 est de 60% et 54%, respectivement.

La liaison de la protéine L30 sur son propre transcrite dépend d'une structure *kink-turn* impliquant 25 nt se retrouvant dans la séquence -58 nt à 6 nt (Figure 1A). L'appariement de la séquence 5'ss avec le 5'UTR génère une section de la tige et la boucle interne correspond au site de liaison de L30 (ENG et WARNER, 1991). La distance entre la séquence 5'ss et le site de liaison de L30 est primordiale pour inhiber l'épissage. Par exemple, si la distance entre ces deux sites est augmentée de 3 à 6 nt, il n'y a aucun impact sur l'inhibition de l'épissage, mais cette inhibition n'est plus observée lorsque la distance est augmentée à 12 nt (MACÍAS *et al.*, 2008). De plus, la boucle interne asymétrique est fermée par une paire potentielle G • U et est constituée principalement de purines (LI *et al.*, 1995a). Cette structure ressemble à celle qui permet l'association de la protéine L30 à l'ARN ribosomal 25S (VILARDELL *et al.*, 2000b).

La présence d'une structure *kink-turn* pour réguler l'épissage d'un transcrit n'est pas spécifique à cette protéine ribosomale. En effet, toujours chez *S. cerevisiae*, l'épissage du transcrit RPS14B est régulé par l'association protéique du paralogue RPS14A à la structure *kink-turn* qui est formée du 5'UTR, de l'exon 1 et d'une partie de l'intron (LI *et al.*, 1995b). Pour ces deux cas, la région 5'UTR est impliquée pour la formation de la structure *kink-turn* puisque l'exon 1 est très court, soit de 3 nt pour RPL30 et de 10 nt pour RPS14B. Ainsi, la séquence 5'ss est partiellement ou totalement impliquée lors de la formation des deux structures analysées.

Ces informations suggèrent que le transcrit Rpl30-2 pourrait être régulé par la présence d'une structure *kink-turn*. En prenant en considération que la séquence 5'ss est impliquée pour la formation d'une structure *kink-turn*, il est peu probable que la séquence 5'UTR soit utilisée puisque la taille de l'exon 1 est de 263 nt. De plus, l'homologie entre le 5'UTR de RPL30 et de Rpl30-2 n'est que 43%, ce qui n'est pas très significatif. Aussi, les séquences 5'UTR impliquées pour la structure *kink-turn* ne sont pas conservées chez *S. pombe*. Par conséquent, la séquence de l'exon 1 de Rpl30-2 pourrait remplacer la séquence 5'UTR lors de la formation de la structure *kink-turn*. L'analyse du pré-ARNm Rpl30-2 par le logiciel *mFold* propose plusieurs structures secondaires pour ce transcrit. Deux prédictions d'appariement pour la séquence 5'ss sont envisageables. La première possibilité est que 5 nt de la séquence 5'ss (GUAAGU) s'apparie à la séquence du site de branchement (ACUAAC). Cette possibilité est intéressante puisque le recrutement de la protéine Rpl30-1 dépendrait principalement de la séquence intronique. Cette option structurelle est soutenue par le résultat démontrant que l'intron Rpl30-2 est suffisant pour réguler l'épissage d'un transcrit (Chapitre 3, Figure 6F). Par contre, la structure secondaire de cet appariement ne forme qu'une structure tige n'ayant aucune possibilité de générer une boucle interne (Figure 1B). Alors, il est peu probable que cet appariement pourrait être impliqué pour le recrutement de Rpl30-1 au pré-ARNm Rpl30-2.

La deuxième possibilité est que la séquence du 5'ss s'apparie à la séquence GCUGCU se retrouvant 31 nt en amont de l'intron. Cet appariement est plus faible, mais les séquences adjacentes supportent la formation d'une tige. De plus, il y a formation d'une

boucle interne asymétrique riche en purine située à 4 nt en amont de la séquence 5'ss (Figure 1C). Par conséquent, la distance entre la séquence 5'ss et le possible site de liaison de Rpl30-1 est relativement courte et pourrait soutenir le fait que la protéine Rpl30-1 régule l'épissage de Rpl30-2. Pour supporter cette éventuelle structure, la séquence GCUGCU est uniquement retrouvée chez Rpl30-2, ce qui devient un élément de séquence spécifique pour Rpl30-2. Il est vrai que la boucle interne n'est pas fermée par une paire G • U et que cette structure ne comprend pas autant de nucléotides que celle de RPL30, mais cette structure pourrait être quand même envisageable. Dans ce contexte, l'exon 1 et la séquence 5'ss de Rpl30-2 seraient impliqués pour la formation d'une structure permettant le recrutement possible de la protéine Rpl30-1.

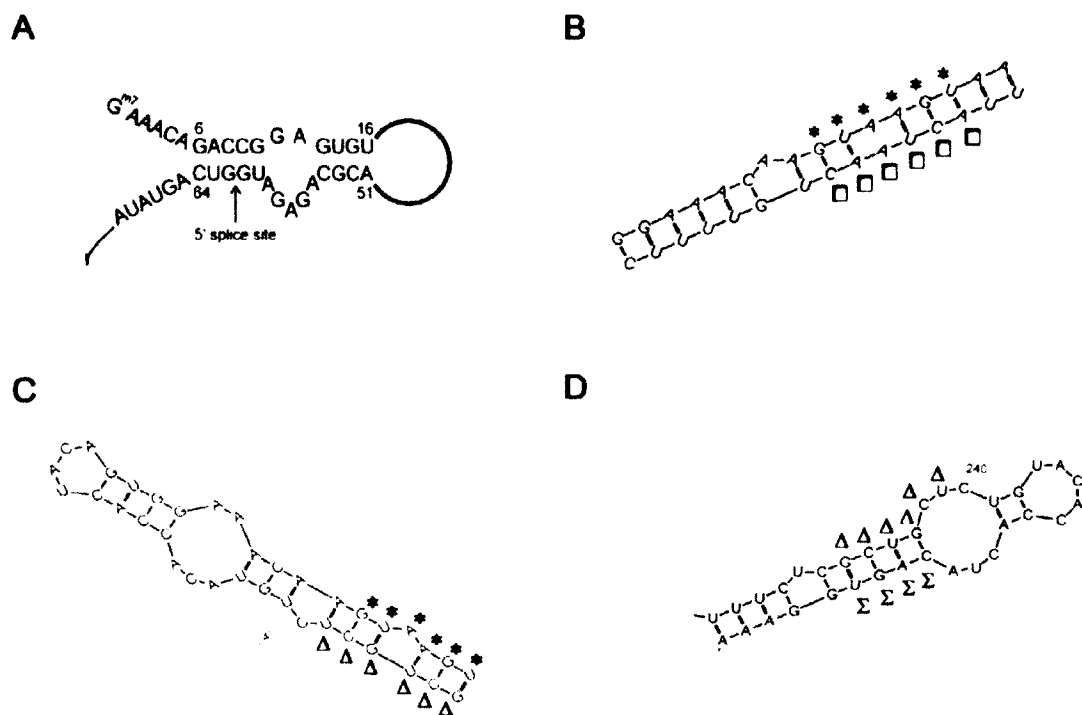


Figure 1. La structure *kink-turn* pour RPL30 et l'analyse de *mFold* pour le pré-ARNm et ARNm Rpl30-2 afin d'identifier de possibles structures *kink-turn*.

(A) La structure *kink-turn* pour le pré-ARNm RPL30 chez *S. cerevisiae*. Figure tirée de VILARDELL *et al.*, (2000a). (B-C) Les structures envisagées par *mFold* pour le pré-ARNm Rpl30-2 impliquant la séquence 5'ss. (D) La structure envisagée par *mFold* pour l'ARNm Rpl30-2 impliquant la séquence GCUGCU. (*) Séquence 5'ss, (□) Séquence du site de branchement, (Δ) Séquence GCUGCU et (Σ) Séquence CAGU.

Parallèlement, les résultats présentés dans la figure 6B du chapitre 3 suggèrent que des éléments présents dans les séquences exoniques permettraient à la protéine Rpl30-1 de réguler l'ARNm Rpl30-2. Ainsi, le même exercice de prédiction structurale a été refait avec seulement les séquences exoniques et cette analyse suggère la formation de plusieurs structures pour ces séquences. Afin de mieux cibler les options structurales et pour garder une spécificité pour Rpl30-2, la séquence GCUGCU est prise en considération pour une éventuelle structure *kink-turn* pour l'ARNm Rpl30-2. Ce critère est tout à fait logique puisque la séquence 5'UTR de RPL30 qui s'apparie avec la séquence 5'ss pour générer la structure *kink-turn*, est aussi impliquée pour former la même structure avec l'ARNm (MAO *et al.*, 1999). Avec ce critère, plusieurs structures sont éliminées et une seule reste intéressante. La séquence GCUGCU est partiellement appariée à la séquence CAGU, localisée à la fin de l'exon 1, pour former une tige jumelée à une boucle interne symétrique (Figure 1D). Par contre, cette boucle interne n'est pas purine riche et cette structure n'est pas identique à celle proposée pour la régulation du pré-ARNm (exon 1 et la séquence 5'ss). Ainsi, il est probable que la structure *kink-turn* qui permet de réguler l'ARNm Rpl30-2 diffère du pré-ARNm. Cette différence est logique puisque l'impact de Rpl30-1 est plus robuste sur le pré-ARNm que l'ARNm, soit de 9 fois et de 2 fois, respectivement. Ainsi, les propriétés de la structure *kink-turn* du pré-ARNm favorisent davantage l'association de Rpl30-1 que celles de l'ARNm. Il est à noter que la possible différence entre les deux structures *kink-turn* n'est pas observable chez RPL30. En effet, la structure *kink-turn* pour le pré-ARNm et l'ARNm RPL30 ne diffère que d'un seul nucléotide, puisque cette structure implique davantage la séquence 5'UTR et que les premiers nucléotides de l'exon 2 (GCC) ressemblent au début de la séquence 5'ss (GTC).

Du moins, le logiciel *mFold* permet de proposer des séquences de Rpl30-2 pouvant s'apparier entre elles pour former une structure secondaire qui ressemble à celle observée pour RPL30. Par conséquent, cette analyse est un excellent outil pour commencer à caractériser les nucléotides de Rpl30-2 permettant la liaison de la protéine Rpl30-1. Pour compléter cette analyse, il serait envisageable de réaliser des mutations ponctuelles aux séquences pouvant former les structures *kink-turn*. Pour confirmer l'implication de ces séquences, l'analyse devra être réalisée en présence et en absence de Rpl30-1. Si cette

séquence est requise pour la liaison de la protéine Rpl30-1, la quantité d'ARNm en présence et en absence de la protéine Rpl30-1 sera à des niveaux très semblables à identiques. Il est probable que cette expérience ciblera spécifiquement les séquences requises pour le recrutement de Rpl30-1. Si ce n'est pas le cas, il serait intéressant d'analyser systématiquement les séquences introniques par différentes chimères. Par exemple, il serait possible de prendre la première moitié de l'intron Rpl30-2 et de compléter l'intron avec la deuxième moitié d'un autre intron insensible à Rpl30-1 et à Pab2, dont Rps3. Parallèlement à cette analyse, il sera possible de jumeler les exons pour aussi cibler ces séquences. Il est vrai que cette analyse peut être ardue et difficile à interpréter, mais il est certain que l'une des deux alternatives expérimentales identifiera les séquences requises pour former la structure *kink-turn*.

La structure *kink-turn* a bien été caractérisée chez *S. cerevisiae* et pourrait être une structure envisageable pour réguler l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2 par la protéine Rpl30-1. L'autre aspect impliqué pour le mécanisme de régulation du transcrit RPL30 est la liaison de la protéine L30 à la structure *kink-turn* et cette protéine ressemble à la protéine Rpl30-1 avec une homologie de 64% (Figure 2A). Pour la centaine de résidus, seulement les 15 premiers acides aminés de Rpl30-1 divergent davantage de ceux de L30 avec l'ajout d'une séquence de six acides aminés spécifiques pour Rpl30-1. Il est à noter qu'aucun autre acide aminé n'est ajouté pour le reste de la protéine Rpl30-1 par rapport à la protéine L30.

Tout comme la structure *kink-turn*, la conformation protéique de L30 chez *S. cerevisiae* a été caractérisée, cette fois-ci, par la technique du RMN. Cette protéine est composée de quatre hélices α (Ser9-Ile18, Tyr27-Glu36, Val50-Leu62 et Glu76-Thr79) et de quatre feuillets β (Lys22-Gly26, Leu41-Ala45, Lys66-Phe70 et Val89-Leu93) qui sont disposés en alternance (Figure 2A-B). La structure secondaire est stabilisée par des liaisons hydrogènes et des interactions ioniques qui fournissent, entre autres, une stabilisation intra-hélice (Lys53 et Glu57), inter-hélice (Arg35 et Glu55) et intra-brin (Lys22 et Glu94) (MAO et WILLIAMSON, 1999).

L'alignement des acides aminés entre les protéines L30 et Rpl30-1 suggère que les structures secondaires démontrées chez *S. cerevisiae* seraient envisageables pour la protéine Rpl30-1 (Figure 2A). En effet, seuls les feuillets $\beta 3$ et $\beta 4$ ont une faible homologie entre les acides aminés (20% et 40% d'identité, respectivement). Pour les 4 hélices α et les 2 autres feuillets β , l'homologie identique entre les acides aminés est significative puisqu'elle varie entre 60% et 92%. De plus, certains acides aminés de L30 ont été substitués par des acides aminés ayant des propriétés semblables chez Rpl30-1, notamment l'acide glutamique (position 76, L30) en acide aspartique. Ainsi, les propriétés physico-chimiques des hélices α et des feuillets β sont pour la plupart des cas conservés. Il ne faut pas oublier que les acides aminés entre les structures secondaires sont aussi importants pour générer le repliement tertiaire de la protéine. Ainsi, ces acides aminés sont relativement homologues, sauf ceux localisés entre le feuillet $\beta 3$ et l'hélice $\alpha 4$. L'analyse plus approfondie de la protéine L30 démontre que la conformation tertiaire de cette protéine est très spécifique et forme un sandwich à trois étages $\alpha\beta\alpha$ (Figure 2B). Cette structure tertiaire est essentiellement stabilisée par des interactions hydrophobes produites par un certain nombre de résidus hydrophobes et aromatiques conservés entre les espèces. Par conséquent, la plupart des interactions dénombrées (MAO et WILLIAMSON, 1999) sont envisageables pour la protéine Rpl30-1 puisque la majorité des acides aminés impliqués sont conservés chez *S. pombe*. Ainsi, sur la base d'homologie de séquences, il est fort probable que la conformation tertiaire de Rpl30-1 ressemble à celle observée pour L30.

Il est tout à fait pertinent de connaître la conformation tertiaire de la protéine L30 afin d'identifier les acides aminés qui seront indispensables pour interagir à la structure *kink-turn*. Ainsi, le groupe de Williamson a pu définir ces acides aminés par le RMN (Figure 2B). À priori, la structure tertiaire de la protéine L30 liée à la structure *kink-turn* est très similaire à celle de la protéine libre. Toutefois, la différence structurelle la plus importante est que la quatrième hélice α est plus longue, soit de la Gly73-Val81 au lieu de Glu76-Thr79 (MAO et WILLIAMSON, 1999).

L'association de la protéine L30 à la structure *kink-turn* nécessite plusieurs interactions qui sont médiées par des liaisons de van der Waals et par des liaisons

hydrogènes (MAO *et al.*, 1999) (Figures 2B). Tous les résidus impliqués pour ces interactions ont été comparés avec ceux de la protéine Rpl30-1 et seulement la Thr48 n'est pas conservée. Ce résidu est remplacé par une cystéine et cette substitution est aussi observée chez l'humain et le poulet (Figure 2C). En ce qui concerne les autres résidus, ils sont tous conservés pour cinq organismes (Figure 2C). Ainsi, ces résidus hautement conservés suggèrent que ceux-ci seront requis pour l'interaction entre le pré-ARNm Rpl30-2 et la protéine ribosomale Rpl30-1.

Il est clair que les différentes analyses réalisées chez *S. cerevisiae* sont d'excellentes bases pour caractériser l'interaction entre l'ARN Rpl30-2 et la protéine Rpl30-1. À cette étape, ce n'est que des hypothèses qui devront être vérifiées par plusieurs analyses de substitutions. Le plus grand défi sera de caractériser clairement la liaison de la protéine Rpl30-1 à la structure *kink-turn* de Rpl30-2. En effet, l'analyse du pré-ARNm Rpl30-2 par le logiciel *mFold* propose une structure pouvant ressembler à celle de RPL30, mais ce n'est clairement pas les mêmes nucléotides qui sont impliqués. Par conséquent, la liaison de Rpl30-1 à la structure *kink-turn* de Rpl30-2 pourrait différer et impliquer d'autres nucléotides.

Il est certain qu'avant de commencer les analyses sur la séquence de Rpl30-2 et la conformation tertiaire de Rpl30-1, il serait important de démontrer une relation directe entre la protéine Rpl30-1 et le pré-ARNm Rpl30-2 par des expériences d'immunoprécipitation d'ARN (RIP). Pour immunoprécipiter la protéine Rpl30-1, il suffit d'ajouter un tag puisqu'il n'existe pas d'anticorps contre cette protéine chez *S. pombe* et l'anticorps polyclonal contre L30 de *S. cerevisiae* ne permet pas de détecter spécifiquement la protéine Rpl30-1 ou Rpl30-2. Par contre, le choix du tag est d'une grande importance pour cette petite protéine de 12 kDa puisque plusieurs tags ont été testés avant d'en trouver un qui n'affectait pas la fonctionnalité de Rpl30-1. Deux résultats préliminaires encourageants ont été obtenus avec 3xMyc-Rpl30-1 et 2xFlag-Rpl30-1 puisque ces deux protéines sont détectables et sont environ 65% fonctionnellement actives (données non publiées). Il est vrai que ces protéines ne sont pas complètement fonctionnelles, mais il devrait être possible de les utiliser pour vérifier cette hypothèse.

Pour confirmer le rôle spécifique de la protéine Rpl30-1 sur le transcrit Rpl30-2, l'analyse du RIP devra démontrer que Rpl30-1 ne s'associe pas à d'autres ARNm, tels que les transcrits codant pour des protéines ribosomales et différentes classes de protéines. Par contre, le RIP ne ciblera pas la région de l'ARN permettant le recrutement de Rpl30-1 puisque cette expérience permet uniquement d'établir l'association existante entre une protéine et un ARN en particulier. Le CHIP pourrait mieux cibler la région du transcrit permettant le recrutement de Rpl30-1, mais cette technique n'est pas possible puisque plusieurs protéines ribosomales sont recrutées à une variété de gènes (SCHRODER et MOORE, 2005).

Auparavant, il avait été répertorié que la protéine L30 lie son propre pré-ARNm et cette liaison régule l'épissage de ce transcrit (VILARDELL et WARNER, 1994). Une étude plus exhaustive montre que la liaison de la protéine L30 à la structure *kink-turn* n'affecte pas le recrutement de U1 snRNP à la séquence 5'ss de même que les facteurs associés à U2 snRNP (BBP et Mud2) à la séquence du site de branchement. Par contre, l'association de L30 à son pré-ARNm inhibe l'association de U2 snRNP au site de branchement (MACÍAS *et al.*, 2008). Ainsi, ces travaux suggèrent que la protéine L30 réprime l'assemblage du spliceosome associé à son pré-ARNm.

Selon ces caractéristiques, il serait possible d'envisager le même mécanisme de régulation de l'épissage pour le pré-ARNm Rpl30-2. Cette hypothèse est adressée par la technique du RIP qui consiste à immunoprécipiter une protéine d'intérêt impliquée dans l'épissage et à analyser la quantité de pré-ARNm Rpl30-2 liant cette protéine lors de la surexpression de la protéine Rpl30-1. Ainsi, la protéine d'intérêt immunoprécipitera moins de pré-ARNm Rpl30-2 si la surexpression de Rpl30-1 régule l'épissage de ce pré-ARNm à cette étape ou à une étape subséquente de l'épissage. Pour favoriser les possibilités d'immunoprécipiter le pré-ARNm Rpl30-2, l'expérience est réalisée à partir de souches *Δpab2* afin de bloquer la dégradation du pré-ARNm par Rrp6. L'analyse de cette expérience consistera à comparer le niveau d'immunoprécipitation du pré-ARNm Rpl30-2 en contexte endogène de Rpl30-1 et de surexpression de Rpl30-1.

Initialement, l'association du complexe U1 au pré-ARNm a été analysée par la protéine Usp104. Par contre, cette expérience préliminaire n'est pas concluante puisque l'immunoprécipitation de cette protéine n'a pas fonctionné. Par la suite, la même expérience a été réalisée avec une protéine associée au complexe U2, Lea1. L'analyse démontre que la protéine Lea1 immunoprécipite 33% moins de pré-ARNm Rpl30-2 lors de la surexpression de Rpl30-1 que dans un contexte endogène de Rpl30-1. Cette diminution semble être spécifique puisque des niveaux semblables de pré-ARNm Dbp2 ont été immunoprécipités dans ces conditions expérimentales (Figure 3). Ainsi, cette analyse semble corroborer avec les données obtenues chez *S. cerevisiae*.

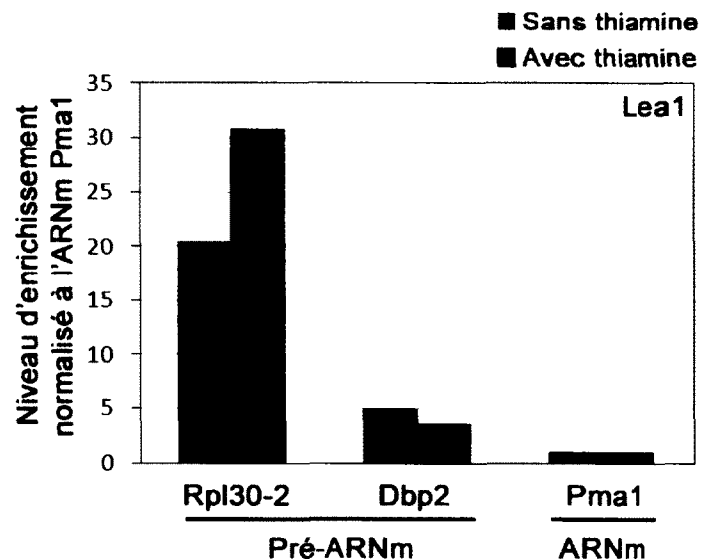


Figure 3. La protéine Rpl30-1 régule l'épissage de Rpl30-2 par la diminution du recrutement du complexe U2.

L'analyse du RIP de la protéine Lea1 (Complexe U2) lors de la surexpression de la protéine Rpl30-1 (sans thiamine) et de l'expression endogène de cette protéine (avec thiamine). Le niveau d'enrichissement du pré-ARNm Rpl30-2 et Dbp2 est normalisé à l'ARNm Pma1. Données non publiées.

Comme cette analyse n'a été réalisée qu'une seule fois, il serait préférable d'obtenir un réplicat biologique avant de conclure que la protéine Rpl30-1 régule l'épissage de Rpl30-2 par la diminution du recrutement du complexe U2. De plus, il serait tout à fait

pertinent de vérifier l'effet de la surexpression de Rpl30-1 sur le recrutement du complexe U1 au pré-ARNm. Ainsi, il faudrait soit changer le tag couplé à la protéine Usp104 ou choisir un autre facteur protéique associé à ce complexe. Jusqu'à présent, on suppose que la protéine Rpl30-1 régule spécifiquement l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2, mais il serait important de tester un plus grand nombre de pré-ARNm afin de confirmer cette spécificité de Rpl30-1.

Par conséquent, selon les caractéristiques connues de *S. cerevisiae*, il est tout à fait logique de penser que l'épissage de Rpl30-2 est régulé par la liaison de la protéine Rpl30-1 à la structure *kink-turn* de Rpl30-2. Il est certain qu'il faudra avant tout établir l'association de la protéine Rpl30-1 au pré-ARNm Rpl30-2 avant d'identifier les nucléotides et les acides aminés impliqués.

L'insensibilité du pré-ARNm Rpl30-2 au NMD

Précédemment, le papier de Vilardell mentionnait qu'une grande proportion du transcrit non épissé RPL30 se retrouvait au cytosol chez *S. cerevisiae* et que la plupart des pré-ARNm sont encore liés à la protéine L30. Seulement une petite fraction des pré-ARNm est initiée à la traduction et ceux-ci sont ciblés par le NMD puisqu'ils contiennent sept codons stop prématurés (VILARDELL *et al.*, 2000a). Auparavant, j'ai démontré que le NMD n'est pas impliqué pour contrôler le niveau d'expression de Rpl30-2 (Chapitre 3, Figure S2) sans savoir si ce transcrit se localisait au cytosol. Selon l'information connue chez *S. cerevisiae*, il est pertinent de caractériser si le pré-ARNm Rpl30-2 est exporté au cytosol et si ce transcrit serait insensible au NMD puisque ce pré-ARNm contient sept codons stop situés dans la séquence intronique.

Pour localiser ce transcrit, la technique du FISH a été privilégiée et la sonde se localise dans l'intron de Rpl30-2 afin de cibler uniquement le pré-ARNm. La difficulté majeure a été de choisir une région intronique pour synthétiser la sonde qui s'hybridera adéquatement et spécifiquement au pré-ARNm Rpl30-2. En effet, 70% de l'intron de 246 nt est constitué d'adénines (A) et de thymines (T). Selon ces contraintes, la sonde de 55 nt est de 76% A/T et quatre thymines sont modifiées afin de conjuguer le fluorophore Cy5.

Cette expérience démontre que le pré-ARNm se localise au noyau et que ce transcrit est exporté au cytosol. Ainsi, la localisation du pré-ARNm Rpl30-2 reflète la localisation de RPL30 chez *S. cerevisiae*.

Ce n'est pas un fait nouveau d'observer des pré-ARNm au cytosol. En effet, en contexte WT, le pré-ARNm RPS14B (CRY2) est normalement exporté au cytosol pour être dégradé par le NMD (LI *et al.*, 1995b). Selon d'autres résultats, les pré-ARNm inefficacement épissés (CYH2, RP51B et MER2) sont exportés au cytosol afin d'être ciblés par le NMD (HE *et al.*, 1993). De plus, des pré-ARNm se retrouvent au cytosol lorsque l'intron contient des sites d'épissage non consensus, soit le 5'ss et/ou le site de branchement (LEGRAIN et ROSBASH, 1989).

En général, seulement les ARNm sont exportés au cytosol et les pré-ARNm sont retenus au noyau par le contrôle de qualité présent au pore nucléaire. Cette rétention nécessite, entre autres, la protéine Mlp1 qui se localise à l'entrée du pore nucléaire. La fonction de rétention de Mlp1 est médiée par le site 5'ss du pré-ARNm (GALY *et al.*, 2004). Ainsi, les pré-ARNm ayant un site 5'ss non consensus sont relâchés au cytosol. De plus, Mlp1 permet de retenir les pré-ARNm où le spliceosome commence à s'assembler, dont les pré-ARNm associés à la protéine BBP/scSF1 (RUTZ et SÉRAPHIN, 2000). Aussi, les pré-ARNm étant défectueux pour l'une des deux réactions de transestérification sont retenus au noyau puisque le spliceosome est assemblé au pré-ARNm (LEGRAIN et ROSBASH, 1989; RAIN et LEGRAIN, 1997; RUTZ et SÉRAPHIN, 2000). Par contre, une majorité des pré-ARNm sont dégradés par des enzymes cytoplasmiques lorsque le spliceosome est incapable de s'assembler au pré-ARNm (HILLEREN et PARKER, 2003).

Tel que mentionné à la figure 3, le complexe U2 aurait de la difficulté à s'associer correctement au pré-ARNm Rpl30-2 lorsque la protéine Rpl30-1 lie ce pré-ARNm, ce qui pourrait entraîner l'export de ce pré-ARNm au cytosol. Par contre, le pré-ARNm Rpl30-2 pourrait être aussi retenu au noyau puisque les séquences 5'ss et du site de branchement sont consensus. Ainsi, il y a des arguments tant pour la rétention du pré-ARNm Rpl30-2 au noyau que pour son export au cytosol.

Pour vérifier la première possibilité qui permettrait d'expliquer l'export du pré-ARNm Rpl30-2 au cytosol, il faudrait réaliser du FISH contre ce pré-ARNm dans une souche *Δrpl30-1*. L'utilisation de cette souche est primordiale puisque la protéine Rpl30-1 est absente pour réguler l'épissage du pré-ARNm Rpl30-2. Cet aspect est démontré par l'augmentation de l'ARNm Rpl30-2 sans toutefois modifier la quantité du pré-ARNm (Chapitre 3, Figure 6B; données non publiées). Ainsi, dans ce contexte, le spliceosome est capable de bien s'associer et devrait se refléter par la rétention du pré-ARNm au noyau. Parallèlement à ce point, l'export du pré-ARNm Rpl30-2 pourrait être causé par le fait que la séquence 5'ss est camouflée par la protéine Rpl30-1. Ainsi, le contrôle de qualité au pore nucléaire ne parvient pas à discriminer le pré-ARNm d'un ARNm. Par contre, l'expérience de FISH réalisée avec la souche *Δrpl30-1* ne permettra pas de discriminer entre les deux hypothèses.

Si cette expérience de FISH ne parvient pas à détecter une quantité plus importante de pré-ARNm Rpl30-2 au noyau qu'au cytosol, l'hypothèse à envisager serait que la séquence 5'ss pourrait être importante pour la rétention du pré-ARNm au noyau. Dans le contexte *Δrpl30-1*, la séquence 5'ss n'est pas camouflée par la protéine Rpl30-1, mais cette séquence est probablement requise pour former une tige impliquée dans la structure *kink-turn*. Par conséquent, la séquence 5'ss pourrait être moins bien reconnue par la machinerie responsable du contrôle de qualité au pore nucléaire. Ainsi, même si la protéine Rpl30-1 ne s'associe pas à structure *kink-turn*, la séquence 5'ss est déjà appariée à une autre séquence. Il suffirait de détruire cette structure par la substitution de quelques nucléotides. Il serait tout à fait logique de modifier uniquement les nucléotides se retrouvant dans la séquence qui s'apparie à la séquence 5'ss. Il est vrai qu'il serait possible de détruire la tige en modifiant les nucléotides de la séquence 5'ss, mais cette substitution détruirait la séquence consensus 5'ss et pourrait modifier l'efficacité d'épissage. Par conséquent, ce type de substitution n'est pas préconisé puisque de nouveaux éléments devront être considérés et compliqueront l'analyse des résultats. Pour cette stratégie, il serait pertinent de garder la nature du codon tout en évitant d'incorporer un codon stop afin de faciliter l'interprétation des résultats. Il serait envisageable de penser que ces conditions devront favoriser la rétention du pré-ARNm Rpl30-2 au noyau.

Il est intéressant de constater que le pré-ARNm Rpl30-2 est insensible au NMD malgré la présence de sept codons stop prématurés (Chapitre 3, Figure S2) où trois d'entre eux se localisent dans la première moitié du pré-ARNm. Cette observation ne coïncide pas avec le fait que les transcrits ayant des codons stop prématurés dans la première moitié d'un transcrit favorisent le mécanisme du NMD à reconnaître ces transcrits (WEN et BROGNA, 2010). Pour une des premières fois, le transcrit Rpl30-2 ne se comporte pas de la même façon que le pré-ARNm RPL30 puisque ce dernier est ciblé par le NMD (VILARDELL *et al.*, 2000a). Par contre, cette insensibilité du pré-ARNm Rpl30-2 au NMD n'est pas une nouvelle observation. Ce phénomène a déjà été répertorié pour quelques transcrits dont ceux ayant un codon stop prématuré localisé dans le dernier exon, ce qui est le cas pour le transcrit de la β -globine humaine (HALL et THEIN, 1994). De plus, différentes constructions où l'intron de l'actine est incorporé au transcrit PGK1 sont insensibles au NMD malgré la présence de plusieurs codons stop prématurés qui se localisent dans la première moitié du transcrit. Ces pré-ARNm sont exportés au cytosol, mais les facteurs expliquant cette insensibilité du NMD n'ont pas été caractérisés (HILLEREN et PARKER, 2003).

Dans cet ordre d'idée, le pré-ARNm YRA1 est insensible au NMD malgré la présence de plusieurs codons stop prématurés. Contrairement aux autres transcrits insensibles au NMD, les raisons expliquant cette insensibilité ont été établies. Le pré-ARNm YRA1 n'est pas ciblé par le NMD puisque ce transcrit s'associe à des facteurs inhibant la traduction (Mex67/Mtr2). De plus, le facteur Edc3 s'associe au transcrit tout en stimulant l'action des enzymes Dcp1/Dcp2, celles-ci permettent d'enlever la coiffe. Ce nouveau mécanisme requiert cinq modules de séquences introniques structurellement distincts, mais fonctionnellement interdépendants. Parmi ces modules de séquences, deux modules sont requis pour la liaison du facteur Edc3 et les trois autres modules sont des éléments permettant la répression de la traduction. L'inhibition de la traduction requiert l'hétérodimérique Mex67/Mtr2 qui permet à la fois de renforcer la spécificité du substrat à Edc3 tout en inhibant la susceptibilité de ce pré-ARNm au NMD. Ainsi, la dégradation cytoplasmique du pré-ARNm YRA1 est un processus régulé qui passe par la répression traductionnelle, la reconnaissance du pré-ARNm par Edc3, le recrutement des enzymes

Dcp1/Dcp2 et l'activation de ces enzymes afin d'enlever la coiffe à ce pré-ARNm (DONG *et al.*, 2010).

Ce mécanisme pourrait être applicable au pré-ARNm Rpl30-2, mais il est difficile de transposer directement l'information connue de ce mécanisme à Rpl30-2. En effet, le groupe de Dong *et al.* a identifié des modules de séquences introniques importants pour l'association de Edc3 et de Mex67/Mtr2 et la longueur de ces modules varie entre 50 nt et 200 nt. Ainsi, il est difficile de comparer ces séquences introniques avec ceux de Rpl30-2 et de trouver un motif permettant l'association de ces facteurs à Rpl30-2. Pour vérifier si un mécanisme semblable de dégradation pourrait être envisageable pour Rpl30-2, il faudrait réaliser une première expérience préliminaire. À priori, il faudrait quantifier le pré-ARNm Rpl30-2 dans un contexte *Δedc3*. Tout comme chez *S. cerevisiae*, cette protéine n'est pas essentielle à la viabilité des cellules et celle-ci stimule l'action enzymatique de Dcp1/Dcp2. Par conséquent, si ce facteur cible le pré-ARNm Rpl30-2, il sera possible de détecter une quantité plus importante de ce pré-ARNm dans une souche *Δedc3* que dans une souche WT. Si cette analyse soulève un indice pertinent pour ce type de mécanisme, il sera important de mieux caractériser cette voie de dégradation, car ce modèle permettrait d'expliquer l'insensibilité du pré-ARNm Rpl30-2 au NMD.

Ce mécanisme soulève un point important à prendre en considération pour comprendre l'insensibilité du NMD. Un transcrit doit obligatoirement être traduit pour activer le NMD. Ainsi, une mutation au codon initiateur ATG ou l'insertion d'une structure tige-boucle dans le 5'UTR inhibe l'initiation de la traduction, ce qui désactive la voie du NMD (NAEGER *et al.*, 1992; BELGRADER *et al.*, 1993). Ces deux possibilités ne sont pas envisageables pour le transcrit Rpl30-2 puisque le codon initiateur du transcrit est un ATG et il n'est pas possible de distinguer la présence d'une tige-boucle dans le 5'UTR par le logiciel *mFold*. Ainsi, ces deux éléments n'expliquent toujours pas pourquoi l'insensibilité du pré-ARNm Rpl30-2 au NMD.

Selon les dernières informations, il faudrait vérifier si le pré-ARNm Rpl30-2 est traduit. Pour vérifier cet aspect, l'analyse des polysomes par gradient de sucrose sera préconisée afin d'établir la proportion d'ARNm et du pré-ARNm Rpl30-2 associée aux polysomes. Pour ce type d'analyse, il faudra trouver quelques contrôles adéquats afin d'interpréter correctement les résultats, dont un ARNm activement traduit (par exemple, ADH1) qui permettra d'observer le profil d'un transcrit associé au polysome. De plus, il faudra utiliser un transcrit sensible au NMD qui sera principalement associé à un seul ribosome. Le dernier contrôle pertinent sera un transcrit insensible au NMD malgré la présence de codons stop prématurés. Dans un premier temps, cette expérience sera réalisée dans une souche WT afin de déterminer un ratio entre les sous-unités libres et les polysomes pour les différents contrôles mentionnés. Ainsi, la comparaison du profil de polysome entre le pré-ARNm Rpl30-2 et les différents contrôles permettra de suggérer si ce pré-ARN peut être traduit.

Parallèlement à cette expérience, il serait intéressant de vérifier la quantité de pré-ARNm Rpl30-2 associé au polysome dans une souche $\Delta rpl30-1$, si ce pré-ARNm se localise toujours au cytosol. Cette expérience serait pertinente puisque la liaison de la protéine L30 à la structure *kink-turn* du pré-ARNm RPL30 régule la traduction de ce dernier (DABEVA et WARNER, 1993). Jusqu'à présent, aucune évidence n'a pu déterminer si la liaison de la protéine Rpl30-1 sur le pré-ARNm Rpl30-2 régule la traduction de ce transcrit. Je ne crois pas que l'association de Rpl30-1 au pré-ARNm Rpl30-2 régulerait la traduction de ce transcrit. En effet, la structure *kink-turn* de RPL30 et celle envisagée pour Rpl30-2 divergent certainement par les séquences impliquées. Cette structure comprend le codon initiateur et le 5'UTR pour le transcrit RPL30, toutefois ce ne sera probablement pas le cas pour Rpl30-2. Ainsi, l'initiation de la traduction du pré-ARNm Rpl30-2 ne sera pas inhibée par la structure *kink-turn*.

L'analyse des polysomes permettra de déterminer si le pré-ARNm peut être traduit et si ce transcrit a la possibilité de générer une protéine tronquée ayant une possible fonction pour la cellule. Ce phénomène a été étudié pour le transcrit de la β -globine humaine. En effet, ce transcrit est insensible au NMD lorsque le codon stop prématuré se localise dans le

dernier exon et la traduction de celui-ci donnerait lieu à une protéine tronquée qui se répercute cliniquement par une β -thalassémie (HALL et THEIN, 1994). Il est clair que l'expérience des polysomes ne détecte pas la présence de protéines, mais la possibilité qu'un pré-ARNm soit traduit. L'analyse des protéines peut-être ardue puisqu'il sera difficile de discriminer les protéines tronquées des produits de dégradations protéiques.

Il est certain que la présence du pré-ARNm Rpl30-2 au cytosol et cette insensibilité au NMD soulèvent plusieurs questions qui devront être abordées point par point. Selon la littérature, l'insensibilité du NMD pourrait s'expliquer par le fait que le pré-ARNm Rpl30-2 n'est pas susceptible à être traduit et qu'il échapperait à la voie du NMD. Par conséquent, le premier aspect à vérifier est la possibilité que ce pré-ARNm soit traduit avant d'envisager un mécanisme semblable au pré-ARNm YRA1.

La fonction biologique de la régulation du pré-ARNm Rpl30-2

Précédemment, une analyse globale sur l'expression génique mentionnait qu'un stress thermique entraînait une régulation positive sur l'expression de Rpl30-2 (CHEN *et al.*, 2003). De mon côté, j'ai reproduit ce résultat tout en démontrant que cette régulation nécessite le pré-ARNm et requière la présence de Pab2 (Chapitre 3, Figure 4). La même étude de Chen *et al.* démontrait, lors d'un stress thermique, une régulation négative du paralogue de Rpl30-2, soit Rpl30-1. Ce résultat est tout à fait intéressant puisqu'il soulève la possibilité d'interrelation entre ces deux paralogues et/ou des fonctions distinctes.

Plusieurs gènes codant pour les protéines ribosomales sont dupliqués, soit 75% et 70% chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, respectivement (site web RPG, Ribosomal Protein Gene Database). Initialement, il a été proposé que la duplication de ces gènes permette d'ajuster la quantité de protéines ribosomales requise pour la synthèse et l'assemblage du ribosome (ROTENBERG *et al.*, 1988). De plus, la surexpression d'un des paralogues lorsque l'autre paralogue est délété rétablit le défaut de croissance observée (ROTENBERG *et al.*, 1988; GU *et al.*, 2003). Ainsi, ces données proposent que les paralogues ont des fonctions redondantes au sein de la cellule.

Par contre, des études plus exhaustives ont démontré que l'un des deux gènes paralogues codant pour les protéines ribosomales peut agir spécifiquement sur une étape du processus cellulaire tel que la sporulation (ENYENIHI et SAUNDERS, 2003), la sélection du site de bourgeonnement (NI et SNYDER, 2001), l'organisation de l'actine (HAARER *et al.*, 2007) et l'assemblage du ribosome (KOMILI *et al.*, 2007). Par exemple, la délétion de Rpl12a réduit l'expression des gènes codant pour le ribosome tandis que la délétion de Rpl12b diminue l'expression des gènes impliqués dans la modification des ARN ribosomiaux (KOMILI *et al.*, 2007).

Selon toutes ces informations, il est envisageable de penser que la protéine Rpl30-2 a des fonctions spécifiques au sein de la cellule par rapport à celles de Rpl30-1. Pour supporter cette possibilité, j'ai observé à une température permissive que la délétion de Rpl30-2 n'a aucun effet sur la croissance cellulaire par rapport à une souche WT tandis que le temps de doublement des cellules $\Delta rpl30-1$ est ralenti d'environ 2 fois (données non publiées). Selon cette observation, il serait possible d'envisager que la protéine Rpl30-1 détient un rôle plus important que la protéine Rpl30-2 au sein de la cellule. Toutefois, une étude a établi que la souche $\Delta Rps27a$ croît au même rythme qu'une souche WT malgré l'assemblage inadéquat du ribosome (BAUDIN-BAILLIEU *et al.*, 1997). Ainsi, le taux de croissance observée pour une souche nulle pour l'un des paralogues n'est pas un indice suffisant pour déterminer l'importance de ce paralogue au sein de la cellule.

Pour vérifier les fonctions des protéines Rpl30, il serait pertinent de trouver quelques stress provoqués par différentes drogues qui causeraient un phénotype spécifique à l'un des paralogues. Déjà, pour faciliter le choix des drogues, il a été répertorié que cinq drogues (staurosporine, MMS, NaCl, caféine et hygromycine B) liés à la synthèse protéique induisent un défaut de croissance tout en affectant l'expression des gènes dupliqués (PARENTEAU *et al.*, 2011). Une fois qu'un stress sera identifié, il serait, entre autres, intéressant de vérifier l'effet du phénotype sur la traduction de plusieurs ARNm. Cet aspect d'analyse devrait être préconisé puisque les paralogues de Rpl30 sont impliqués pour la formation du ribosome. Il serait envisageable de penser qu'un des paralogues pourraient influencer positivement ou négativement la traduction de certains ARNm lors d'un stress,

par exemple. Parallèlement à cette hypothèse, il a été répertorié que les ribosomes qui manquent une ou plusieurs protéines ribosomales sont toujours fonctionnels, mais ces ribosomes influencent spécifiquement la traduction de certains ARNm (GILBERT, 2011).

Une analyse préliminaire avec la staurosporine démontre qu'une souche $\Delta rpl30-1$ croît mieux que la souche $\Delta rpl30-2$ (donnée préliminaires non publiées). Ce résultat propose que la protéine Rpl30-2 semble avoir une fonction spécifique pour répondre adéquatement à un tel stress, soit par la traduction de certains transcrits ou par un processus cellulaire induit/inactivé. Ainsi, il envisageable de penser que le transcrit Rpl30-2 est régulé négativement par Rpl30-1 lorsque les cellules poussent en condition permissive et en présence de glucose puisque le paralogue Rpl30-2 n'est pas principalement requis pour la viabilité cellulaire. Par contre, la cellule répondra rapidement à un stress particulier lorsque Rpl30-1 ne régulera plus négativement l'expression du transcrit Rpl30-2 d'autant plus que le transcrit Rpl30-2 est toujours exprimé.

Tel que mentionné au chapitre 3, la régulation entre les deux paralogues Rpl30 impliquent l'intron Rpl30-2. Il serait pertinent de vérifier si la réponse au stress induit par la staurosporine est la même lorsque l'intron de Rpl30-2 est absent. En effet, il a été démontré que l'intron régule la réponse à la drogue (PARENTEAU *et al.*, 2011). Ce groupe a établi que la réponse cellulaire aux drogues sont différentes lorsque le gène est absent par rapport au gène exprimé sans intron.

Jusqu'à présent, l'importance de la régulation du pré-ARNm Rpl30-2 par Rpl30-1 reste à être confirmée, mais la littérature permet de proposer des hypothèses de travail qui pourront être testées expérimentalement.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. François Bachand, qui a cru bon me recruter comme stagiaire à l'été 2006 lorsqu'il démarrait son laboratoire. La passion de François envers ses recherches et tout le temps qui m'a consacré lors de ma formation scientifique m'ont incité à poursuivre aux études graduées afin de compléter un doctorat en biochimie. Merci d'avoir cru en mes capacités scientifiques et de m'avoir donné l'opportunité de me surpasser sur plusieurs aspects lors de ma formation. Ton encadrement, ta confiance, ta liberté et tes différentes propositions ont été grandement appréciés lors de mon cheminement et je t'en suis très reconnaissante.

Je remercie aussi tous les collègues de travail que j'ai côtoyés au cours des années, autant les assistants de recherche (Audrey, Marc, Yves et Annie), les étudiants gradués (Olivier, Jean-François, Pierre-Luc et Valérie), le post-doc Nicolas ainsi que tous les stagiaires. J'aimerais remercier particulièrement Audrey qui a pris le temps de m'expliquer clairement plusieurs aspects techniques et pour les nombreuses conversations variées que l'on a pu avoir. Je désire souligner les précieux conseils de Marc lorsque j'avais certaines questions expérimentales.

Je remercie les membres de mon jury, les Drs. Pascal Chartrand, Benoît Chabot et Xavier Roucou pour avoir accepté d'évaluer ma thèse ainsi que les IRSC pour leur soutien financier au cours de mes études graduées.

Milles mercis à ma famille pour tout leur support inconditionnel même si le sujet de mes travaux n'était pas toujours concret à leurs yeux. Un gros merci à mes amis pour leurs oreilles attentives et pour tous les moments de divertissement qui m'ont permis de décrocher du laboratoire. Un merci tout particulier à mon amoureux François pour sa grande patience durant toutes ses années, pour tous ses encouragements et pour sa grande compréhension. Ta présence à mes côtés lors de moments importants autant les bons que les plus difficiles m'a permis de poursuivre mes études graduées.

RÉFÉRENCES

- Abruzzi, KC., Lacadie, S., and Rosbash, M. (2004). Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and introncontaining yeast genes. *EMBO J.* 23, 2620-2631.
- Afonina, E., Stauber, R., and Pavlakis, GN. (1998). The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273, 13015-13021.
- Ahn, SH., Kim, M., and Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol. Cell* 13, 67-76.
- Alcázar-Román, AR., Tran, EJ., Guo, S., and Wentz, SR. (2006). Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat. Cell Biol.* 8, 711-716.
- Alén, C., Kent, NA., Jones, HS., O'Sullivan, J., Aranda, A., and Proudfoot, NJ. (2002). A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 10, 1441-1452.
- Allison, LA., Wong, JK., Fitzpatrick, VD., Moyle, M., and Ingles, CJ. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol. Cell Biol.* 8, 321-329.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18, 5399-5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148-2158.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, DA., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112-118.
- Amrani, N., Ghosh, S., Mangus, DA., and Jacobson, A. (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453, 1276-1280.
- Anderson, JT., Paddy, MR., and Swanson, MS. (1993). PUB1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 6102-6113.

Antoniou, M., Geraghty, F., Hurst, J., and Grosveld, F. (1998). Efficient 3'-end formation of human beta-globin mRNA *in vivo* requires sequences within the last intron but occurs independently of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* 26, 721-729.

Anvar, SY., 't Hoen, PA., Venema, A., van der Sluijs, B., van Engelen, B., Snoeck, M., Vissing, J., Trollet, C., Dickson, G., Chartier, A., Simonelig, M., van Ommen, GJ., van der Maarel, SM., and Raz, V. (2011). Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet. Muscle* 1, 15.

Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S., and Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 20, 4684-46893.

Arava, Y., Wang, Y., Storey, JD., Liu, CL., Brown, PO., and Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3889-3894.

Azzam, ME., and Algranati, ID. (1973). Mechanism of puromycin action: fate of ribosomes after release of nascent protein chains from polysomes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3866-3869.

Bachand, F., and Silver, PA. (2004). PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J.* 23, 2641-2650.

Bachand, F., Lackner, DH., Bähler, J., and Silver, PA. (2006). Autoregulation of ribosome biosynthesis by a translational response in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 26, 1731-1742.

Bachand, F. (2007). Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryot. Cell* 6, 889-898.

Bähler, J., Wu, JQ., Longtine, MS., Shah, NG., McKenzie, A. 3rd, Steever, AB., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-951.

Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, YC., Collart, MA., Liu, HY., and Denis, CL. (1999). The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol. Cell Biol.* 19, 6642-6651.

Balint, BL., Szanto, A., Madi, A., Bauer, UM., Gabor, P., Benko, S., Puskas, LG., Davies, PJ., and Nagy, L. (2005). Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells. *Mol. Cell Biol.* 25, 5648-5663.

Baudin-Baillieu, A., Tollervy, D., Cullin, C., and Lacroute, F. (1997). Functional analysis of Rrp7p, an essential yeast protein involved in pre-rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell Biol.* 17, 5023-5032.

- Bear, DG., Fomproix, N., Soop, T., Bjorkroth, B., Masich, S., and Daneholt, B. (2003). Nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 is associated with RNA polymerase II during transcription and accompanies the released transcript to the nuclear pore. *Exp. Cell Res.* 286, 332-344.
- Beaudoin, J., and Labbé, S. (2006). Copper induces cytoplasmic retention of fission yeast transcription factor *cu1*. *Eukaryot. Cell* 5, 277-292.
- Bedford, MT., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 18, 263-272.
- Bedford, MT. (2007). Arginine methylation at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 4243-4246.
- Bedford, MT., and Clarke, SG. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1-13.
- Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V., and Izaurralde, E. (2007). A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 26, 1591-1601.
- Beilharz, TH., and Preiss, T. (2007). Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome. *RNA* 13, 982-997.
- Belgrader, P., Cheng, J., and Maquat, LE. (1993). Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 482-486.
- Benoit, B., Nemeth, A., Aulner, N., Kühn, U., Simonelig, M., Wahle, E., and Bourbon, HM. (1999). The *Drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *Drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 27, 3771-3778.
- Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I., and Simonelig, M. (2005). An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev. Cell* 9, 511-522.
- Bentley, D. (2002). The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 336-342.
- Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* 12, 585-594.
- Bird, G., Fong, N., Gatlin, JC., Farabaugh, S., and Bentley, DL. (2005). Ribozyme cleavage reveals connections between mRNA release from the site of transcription and pre-mRNA processing. *Mol. Cell* 20, 747-758.

- Birse, CE., Minvielle-Sebastia, L., Lee, BA., Keller, W., and Proudfoot, NJ. (1998). Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science* 280, 298-301.
- Blanchet, F., Cardona, A., Letimier, FA., Hershfield, MS., and Acuto, O. (2005). CD28 costimulatory signal induces protein arginine methylation in T cells. *J. Exp. Med.* 202, 371-377.
- Blanco, P., Sargent, CA., Boucher, CA., Howell, G., Ross, M., and Affara, NA. (2001). A novel poly(A)-binding protein gene (PABPC5) maps to an X-specific subinterval in the Xq21.3/Yp11.2 homology block of the human sex chromosomes. *Genomics* 74, 1-11.
- Boisvert, FM., Côté, J., Boulanger, MC., Cleroux, P., Bachand, F., Autexier, C., and Richard, S. (2002). Symmetrical dimethylarginine methylation is required for the localization of SMN in Cajal bodies and pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 159, 957-969.
- Boisvert, FM., Côté, J., Boulanger, MC., and Richard, S. (2003). A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Mol. Cell Proteomics* 2, 1319-1330.
- Boisvert, FM., Déry, U., Masson, JY., and Richard, S. (2005a). Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev.* 19, 671-676.
- Boisvert, FM., Chénard, CA., and Richard, S. (2005b). Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci. STKE* 2005, re2.
- Bolger, TA., Folkmann, AW., Tran, EJ., and Wentz, SR. (2008). The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation. *Cell* 134, 624-633.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* 139, 547-559.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.
- Brackenridge, S., and Proudfoot, NJ. (2000). Recruitment of a basal polyadenylation factor by the upstream sequence element of the human lamin B2 polyadenylation signal. *Mol. Cell Biol.* 20, 2660-2669.
- Brais, B., Bouchard, JP., Xie, YG., Rochefort, DL., Chrétien, N., Tomé, FM., Lafrenière, RG., Rommens, JM., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, AD., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codère, F., Fardeau, M., and Rouleau, GA. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18, 164-167.

- Brais, B. (2003). Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet. Genome Res.* 100, 252-260.
- Brodsky, AS., and Silver, PA. (2000). Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* 6, 1737-1749.
- Brown, CE., and Sachs, AB. (1998). Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell Biol.* 18, 6548-6559.
- Brune, C., Munchel, SE., Fischer, N., Podtelejnikov, AV., and Weis, K. (2005). Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* 11, 517-531.
- Bucheli, ME., and Buratowski, S. (2005). Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II. *EMBO J.* 24, 2150-2160.
- Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 257-261.
- Calado, A., Kutay, U., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000a). Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA* 6, 245-256.
- Calado, A., Tomé, FM., Brais, B., Rouleau, GA., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000b). Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2321-2328.
- Callahan, KP., and Butler, JS. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* 36, 6645-6655.
- Callahan, KP., and Butler, JS. (2010). TRAMP complex enhances RNA degradation by the nuclear exosome component Rrp6. *J. Biol. Chem.* 285, 3540-3547.
- Calvo, O., and Manley, JL. (2005). The transcriptional coactivator PC4/Sub1 has multiple functions in RNA polymerase II transcription. *EMBO J.* 24, 1009-1020.
- Casolari, JM., and Silver, PA. (2004). Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends Cell Biol.* 14, 222-225.
- Castaño, IB., Heath-Pagliuso, S., Sadoff, BU., Fitzhugh, DJ., and Christman, MF. (1996). A novel family of TRF (DNA topoisomerase I-related function) genes required for proper nuclear segregation. *Nucleic Acids Res.* 15, 2404-2410.
- Castelo-Branco, P., Furger, A., Wollerton, M., Smith, C., Moreira, A., and Proudfoot, N. (2004). Polypyrimidine tract binding protein modulates efficiency of polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 24, 4174-4183.

Chapman, RD., Heidemann, M., Albert, TK., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Transcribing RNA polymerase II is phosphorylated at CTD residue serine-7. *Science* 318, 1780-1782.

Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006). A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.* 25, 2253-2262.

Chartier, A., Raz, V., Sterrenburg, E., Verrips, CT., van der Maarel, SM., and Simonelig, M. (2009). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies *in vivo*. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1849-1859.

Chekanova, JA., and Belostotsky, DA. (2003). Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA* 9, 1476-1490.

Chekanova, JA., Gregory, BD., Reverdatto, SV., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., Alonso, J., Brukhin, V., Grossniklaus, U., Ecker, JR., and Belostotsky, DA. (2007). Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell* 131, 1340-1353.

Chen, J., and Moore, C. (1992). Separation of factors required for cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* 12, 3470-3481.

Chen, Z., Li, Y., and Krug, RM. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 18, 2273-2283.

Chen, CY., Gherzi, R., Ong, SE., Chan, EL., Rajmakers, R., Pruijn, GJ., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464.

Chen, D., Toone, WM., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol. Biol. Cell* 14, 214-229.

Chen, YC., Milliman, EJ., Goulet, I., Côté, J., Jackson, CA., Vollbracht, JA., and Yu, MC. (2010). Protein arginine methylation facilitates cotranscriptional recruitment of pre-mRNA splicing factors. *Mol. Cell Biol.* 30, 5245-5256.

Cheng, H., Dufu, K., Lee, CS., Hsu, JL., Dias, A., and Reed, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* 127, 1389-1400.

Cheng, D., Côté, J., Shaaban, S., and Bedford MT. (2007). The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol. Cell* 25, 71-83.

Chiu, SY., Lejeune, F., Ranganathan, AC., and Maquat, LE. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* 18, 745-754.

Cole, CN., and Scarcelli, JJ. (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 299-306.

Colot, HV., Stutz, F., and Rosbash, M. (1996). The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex. *Genes Dev.* 10, 1699-1708.

Cooke, C., and Alwine, JC. (1996). The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. *Mol. Cell Biol.* 16, 2579-2584.

Corbeil-Girard, LP., Klein, AF., Sasseville, AM., Lavoie, H., Dicaire, MJ., Saint-Denis, A., Page, M., Duranceau, A., Codère, F., Bouchard, JP., Karpati, G., Rouleau, GA., Massie, B., Langelier, Y., and Brais, B. (2005). PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol. Dis.* 18, 551-567.

Côté, J., Boisvert, FM., Boulanger, MC., Bedford, MT., and Richard, S. (2003). Sam68 RNA binding protein is an *in vivo* substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell* 14, 274-287.

Côté, J., and Richard, S. (2005). Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J. Biol. Chem.* 280, 28476-28483.

Cougot, N., van Dijk, E., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem. Sci.* 29, 436-444.

Cowling, VH. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem. J.* 425, 295-302.

Craven, RA., Griffiths, DJ., Sheldrick, KS., Randall, RE., Hagan, IM., and Carr, AM. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene (Amst.)* 221, 59-68.

Dabeva, MD., Post-Beittenmiller, MA., and Warner, JR. (1986). Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5854-5857.

Dabeva, MD., and Warner, JR. (1993). Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. *J. Biol. Chem.* 268, 19669-19674.

- Danckwardt, S., Kaufmann, I., Gentzel, M., Foerstner, KU., Gantzer, AS., Gehring, NH., Neu-Yilik, G., Bork, P., Keller, W., Wilm, M., Hentze, MW., and Kulozik, AE. (2007). Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals. *EMBO J.* 26, 2658-2669.
- Danckwardt, S., Hentze, MW., and Kulozik, AE. (2008). 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J.* 27, 482-498.
- Daneholt, B. (2001). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7012-7017.
- de Almeida, SF., Garcia-Sacristan, A., Custodio, N., and Carmo-Fonseca, M. (2010). A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Res.* 38, 8015-26.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, CG., and Wahle, E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079-1086.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 1128-1140.
- Denman, RB. (2002). Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7, 877-883.
- Deo, RC., Bonanno, JB., Sonenberg, N., and Burley, SK. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98, 835-845.
- Dez, C., Houseley, J., and Tollervey, D. (2006). Surveillance of nuclear-restricted pre-ribosomes within a subnucleolar region of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 25, 1534-1546.
- Dheur, S., Nykamp, KR., Viphakone, N., Swanson, MS., and Minvielle-Sebastia, L. (2005). Yeast mRNA Poly(A) tail length control can be reconstituted *in vitro* in the absence of Pab1p-dependent Poly(A) nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 280, 24532-24538.
- Dichtl, B., and Keller, W. (2001). Recognition of polyadenylation sites in yeast pre-mRNAs by cleavage and polyadenylation factor. *EMBO J.* 20, 3197-3209.
- Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., and Keller, W. (2002a). A role for SSU72 in balancing RNA polymerase II transcription elongation and termination. *Mol. Cell* 10, 1139-1150.
- Dichtl, B., Blank, D., Sadowski, M., Hubner, W., Weiser, S., and Keller, W. (2002b). Yhh1p/Cft1p directly links poly(A) site recognition and RNA polymerase II transcription termination. *EMBO J.* 21, 4125-4135.

- Dong, S., Jacobson, A., and He, F. (2010). Degradation of YRA1 Pre-mRNA in the cytoplasm requires translational repression, multiple modular intronic elements, Edc3p, and Mex67p. *PLoS Biol.* 8, e1000360.
- Dower, K., Kuperwasser, N., Merrikh, H., and Rosbash, M. (2004). A synthetic A tail rescues yeast nuclear accumulation of a ribozyme-terminated transcript. *RNA* 10, 1888-1899.
- Doye, V., Wepf, R., and Hurt, EC. (1994). A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly(A)⁺ RNA transport and nuclear pore distribution. *EMBO J.* 13, 6062-6075.
- Dreyfus, M., and Regnier, P. (2002). The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* 111, 611-613.
- Duncan, K., Umen, JG., and Guthrie, C. (2000). A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr. Biol.* 10, 687-696.
- Dunn, EF., Hammell, CM., Hodge, CA., and Cole, CN. (2005). Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev.* 19, 90-103.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Seraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 15-22.
- Eberle, AB., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, RZ., and Muhlemann, O. (2008). Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol.* 6, e92.
- Eberle, AB., Hessle, V., Helbig, R., Dantoft, W., Gimber, N., and Visa, N. (2010). Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS One* 5, e11540.
- Edmonds, M. (2002). A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71, 285-389.
- Eng, FJ., and Warner, JR. (1991). Structural basis for the regulation of splicing of a yeast messenger RNA. *Cell* 65, 797-804.
- Enyenihi, AH., and Saunders, WS. (2003). Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163, 47-54.
- Enriquez-Harris, P., Levitt, N., Briggs, D., and Proudfoot, NJ. (1991). A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *EMBO J.* 10, 1833-1842.

Ezzeddine, N., Chang, TC., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, CY., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., and Shyu, AB. (2007). Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell Biol.* 27, 7791-7801.

Fabian, MR., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, JT., Svitkin, YV., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, JA., Chen, CY., Shyu, AB., Yates, JR. 3rd, Hannon, GJ., Filipowicz, W., Duchaine, TF., and Sonenberg, N. (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* 35, 868-880.

Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, GA. (2001). Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2341-2351.

Farny, NG., Hurt, JA., and Silver, PA. (2008). Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. *Genes Dev.* 22, 66-78.

Fasken, MB., and Corbett, AH. (2009). Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol.* 6, 237-241.

Féral, C., Guellaën, G., and Pawlak, A. (2001). Human testis expresses a specific poly(A)-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 29, 1872-1883.

Fewell, SW., and Woolford, JL. Jr., (1999). Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol. Cell Biol.* 19, 826-834.

Forsburg, SL. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res.* 21, 2955-2956.

Fribourg, S., Braun, IC., Izaurralde, E., and Conti, E. (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol. Cell* 8, 645-656.

Friesen, WJ., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., and Dreyfuss, G. (2001). SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell* 7, 1111-1117.

Fronz, K., Otto, S., Kölbel, K., Kühn, U., Friedrich, H., Schierhorn, A., Beck-Sickinger, AG., Ostareck-Lederer, A., and Wahle, E. (2008). Promiscuous modification of the nuclear poly(A)-binding protein by multiple protein-arginine methyltransferases does not affect the aggregation behavior. *J. Biol. Chem.* 283, 20408-20420.

Fronz, K., Güttinger, S., Burkert, K., Kühn, U., Stöhr, N., Schierhorn, A., and Wahle, E. (2011). Arginine methylation of the nuclear poly(A) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *J. Biol. Chem.* 286, 32986-32994.

- Fuke, H., and Ohno, M. (2008). Role of poly(A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. *Nucleic Acids Res.* 36, 1037-1049.
- Furuichi, Y., and Shatkin, AJ. (2000). Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virus Res.* 55, 135-184.
- Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., and Nehrbass, U. (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63-73.
- Garas, M., Dichtl, B., and Keller, W. (2008). The role of the putative 3' end processing endonuclease Ysh1p in mRNA and snoRNA synthesis. *RNA* 14, 2671-2684.
- Gary, JD., Lin, WJ., Yang, MC., Herschman, HR., and Clarke, S. (1996). The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271, 12585-12594.
- Gary, JD., and Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 61, 65-131.
- Ge, H., Zhou, D., Tong, S., Gao, Y., Teng, M., and Niu, L. (2008). Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins* 71, 1539-1545.
- Giaever, G., Chu, AM., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, AP., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.
- Gilbert, WV. (2011). Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem. Sci.* 36, 127-132.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., and Bentley, DL. (2008). RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 71-78.
- Goldstrohm, AC., and Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 337-344.
- Gozani, O., Patton, JG., and Reed, R. (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.* 13, 3356-3367.
- Green, DM., Marfatia, KA., Crafton, EB., Zhang, X., Cheng, X., and Corbett, AH. (2002). Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J. Biol. Chem.* 277, 7752-7760.

- Gross, T., Siepmann, A., Sturm, D., Windgassen, M., Scarcelli, JJ., Seedorf, M., Cole, CN., and Krebber, H. (2007). The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination. *Science* 315, 646-649.
- Grzechnik, P., and Kufel, J. (2008). Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast. *Mol. Cell* 32, 247-258.
- Gu, Z., Steinmetz, LM., Gu, X., Scharfe, C., Davis, RW., and Li, WH. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 241, 63-66.
- Gunderson, SI., Beyer, K., Martin, G., Keller, W., Boelens, WC., and Mattaj, LW. (1994). The human U1A snRNP protein regulates polyadenylation via a direct interaction with poly(A) polymerase. *Cell* 76, 531-541.
- Gunderson, SI., Polycarpou-Schwarz, M., and Mattaj, IW. (1998). U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol. Cell* 1, 255-264.
- Guo, Z., Russo, P., Yun, DF., Butler, JS., and Sherman, F. (1995). Redundant 3' end-forming signals for the yeast CYC1 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 4211-4214.
- Guo, Z., and Sherman, F. (1996). 3'-end-forming signals of yeast mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 21, 477-481.
- Haarer, B., Viggiano, S., Hibbs, MA., Troyanskaya, OG., and Amberg, DC. (2007). Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes Dev.* 21, 148-159.
- Hahn, S. (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 394-403.
- Hall, GW., and Thein, S. (1994). Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood* 83, 2031-2037.
- Hall-Pogar, T., Liang, S., Hague, LK., and Lutz, CS. (2007). Specific trans-acting proteins interact with auxiliary RNA polyadenylation elements in the COX-2 3'-UTR. *RNA* 13, 1103-1115.
- Hamm, J., and Mattaj, IW. (1990). Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63, 109-118.
- Hammell, CM., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, CV., Stutz, F., Moore, C., and Cole, CN. (2002). Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol. Cell Biol.* 22, 6441-6457.

- He, F., Peltz, SW., Donahue, JL., Rosbash, M., and Jacobson, A. (1993). Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNAs in a yeast upf1-mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7034-7038.
- Hector, RE., Nykamp, KR., Dheur, S., Anderson, JT., Non, PJ., Urbinati, CR., Wilson, SM., Minvielle-Sebastia, L., and Swanson, MS. (2002). Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J.* 21, 1800-1810.
- Henkin, TM. (2000). Transcription termination control in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 149-153.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.
- Hilleren, P., and Parker, R. (2001). Defects in the mRNA export factors Rat7p, Gle1p, Mex67p, and Rat8p cause hyperadenylation during 3'-end formation of nascent transcripts. *RNA* 7, 753-764.
- Hilleren, PJ., and Parker, R. (2003). Cytoplasmic degradation of splice-defective pre-mRNAs and intermediates. *Mol. Cell* 12, 1453-1465.
- Hino, H., Araki, K., Uyama, E., Takeya, M., Araki, M., Yoshinobu, K., Miike, K., Kawazoe, Y., Maeda, Y., Uchino, M., and Yamamura, K. (2004). Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 13, 181-190.
- Hirose, Y., and Manley, JL. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14, 1415-1429.
- Hocine, S., Singer, RH., and Grünwald, D. (2010). RNA processing and export. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000752.
- Hosoda, N., Lejeune, F., and Maquat, LE. (2006). Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. *Mol. Cell Biol.* 26, 3085-3097.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 529-539.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathway of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.
- Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. (2005). Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential *in vivo* for many subsequent histone modifications. *Genes Dev.* 19, 1885-1893.

Huertas, P., and Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* 12, 711-721.

Humphrey, T., Sadhale, P., Platt, T., and Proudfoot, N. (1991). Homologous mRNA 3' end formation in fission and budding yeast. *EMBO J.* 10, 3503-3511.

Hurt, E., Luo, MJ., Röther, S., Reed, R., and Strässer, K. (2004). Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1858-1862.

Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, LE. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-617.

Jensen, TH., Patricio, K., McCarthy, T., and Rosbash, M. (2001). A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol. Cell* 7, 887-898.

Jia, H., Wang, X., Liu, F., Guenther, UP., Srinivasan, S., Anderson, JT., and Jankowsky, E. (2011). The RNA helicase Mtr4p modulates polyadenylation in the TRAMP complex. *Cell* 145, 890-901.

Johnson, SA., Cubberley, G., and Bentley, DL. (2009). Cotranscriptional recruitment of the mRNA export factor Yra1 by direct interaction with the 3' end processing factor Pcf11. *Mol. Cell* 33, 215-226.

Jurica, MS., and Moore, MJ. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* 12, 5-14.

Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, AM., Hinnebusch, AG., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 18, 1227-1240.

Kaneko, S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., and Manley, JL. (2007). The multifunctional protein p54^{nrb}/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev.* 21, 1779-1789.

Kaufmann, I., Martin, G., Friedlein, A., Langen, H., and Keller, W. (2004). Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *EMBO J.* 23, 616-626.

Keller, C., Woolcock, K., Hess, D., and Bühler, M. (2010). Proteomic and functional analysis of the noncanonical poly(A) polymerase Cid14. *RNA* 16, 1124-1129.

Kelly, SM., and Corbett, AH. (2009). Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. *Traffic* 10, 1199-1208.

- Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., and Wahle, E. (2003). Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* 22, 3705-3714.
- Kessler, SH., and Sachs, AB. (1998). RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell Biol.* 18, 51-57.
- Kim, M., Ahn, SH., Krogan, NJ., Greenblatt, JF., and Buratowski, S. (2004a). Transitions in RNA polymerase II elongation complexes at the 3' ends of genes. *EMBO J.* 23, 354-364.
- Kim, M., Krogan, NJ., Vasiljeva, L., Rando, OJ., Nedeá, E., Greenblatt JF., and Buratowski, S. (2004b). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517-522.
- Kim Guisbert, KS., Li, H., and Guthrie, C. (2007). Alternative 3' pre-mRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by Nab4/Hrp1 *in vivo*. *PLoS Biol.* 5, e6.
- Kim, H., Erickson, B., Luo, W., Seward, D., Graber, JH., Pollock, DD., Megee, PC., and Bentley, DL. (2010). Gene-specific RNA polymerase II phosphorylation and the CTD code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1279-1286.
- Köhler, A., and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 761-773.
- Komarnitsky, P., Cho, EJ., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.* 14, 2452-2460.
- Komili, S., Farny, NG., Roth, FP., and Silver, PA. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131, 557-571.
- Konarska, MM., Padgett, RA., and Sharp, PA. (1984). Recognition of cap structure in splicing *in vitro* of mRNA precursors. *Cell* 38, 731-736.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 21, 13-37.
- Kozlov, G., Trempe, JF., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I., and Gehring, K. (2001). Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4409-4413.
- Kozlov, G., Siddiqui, N., Coillet-Matillon, S., Trempe, JF., Ekiel, I., Sprules, T., and Gehring, K. (2002). Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277, 22822-22828.

- Krainer, AR., Maniatis, T., Ruskin, B., and Green, MR. (1984). Normal and mutant human beta-globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell* 36, 993-1005.
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K., and Wahle, E. (1994). Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* 214, 75-82.
- Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 673-683.
- Krummel, DA., Nagai, K., and Oubridge, C. (2010). Structure of spliceosomal ribonucleoproteins. *F1000 Biol. Rep.* 24, pii: 39.
- Kühn, U., and Pieler, T. (1996). Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* 256, 20-30.
- Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S., and Wahle, E. (2003). The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278, 16916-16925.
- Kühn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 67-84.
- Kühn, U., Gündel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rüdell, S., and Wahle, E. (2009). Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J. Biol. Chem.* 284, 22803-22814.
- Kuhn, AN., and Käufer, NF. (2003). Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*: regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Curr. Genet.* 42, 241-251.
- Kumar, GR., Shum, L., and Glaunsinger, BA. (2011). Importin α -Mediated Nuclear Import of Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein Occurs as a Direct Consequence of Cytoplasmic mRNA Depletion. *Mol. Cell Biol.* 31, 3113-3125.
- Kwak, YT., Guo, J., Prajapati, S., Park, KJ., Surabhi, RM., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, RB. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* 11, 1055-1066.
- Kyburz, A., Sadowski, M., Dichtl, B., and Keller, W. (2003). The role of the yeast cleavage and polyadenylation factor subunit Ydh1p/Cft2p in pre-mRNA 3'-end formation. *Nucleic Acids Res.* 31, 3936-3945.
- Kyburz, A., Friedlein, A., Langen, H., and Keller, W. (2006). Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing. *Mol. Cell* 23, 195-205.

- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724.
- Lackner, DH., Beilharz, TH., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T., and Bähler, J. (2007). A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol. Cell* 26, 145-155.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456, 993-996.
- Lee, MS., Henry, M., and Silver, PA. (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev.* 10, 1233-1246.
- Lee, TI., and Young, RA. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 77-137.
- Lee, J., and Bedford, MT. (2002). PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.* 3, 268-273.
- Lee, YJ., Lee, Y., and Chung, JH. (2000). An intronless gene encoding a poly(A) polymerase is specifically expressed in testis. *FEBS Lett.* 487, 287-292.
- Lee, YJ., and Glaunsinger, BA. (2009). Aberrant herpesvirus-induced polyadenylation correlates with cellular messenger RNA destruction. *PLoS Biol.* 7, e1000107.
- Legrain, P., and Rosbash, M. (1989). Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57, 573-583.
- Lei, EP., Krebber, H., and Silver, PA. (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev.* 15, 1771-1782.
- Lei, EP., and Silver, PA. (2002). Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev.* 16, 2761-2766.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, LE. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675-687.
- Lemay, JF., D'Amours, A., Lemieux, C., Lackner, DH., St-Sauveur, VG., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol. Cell* 37, 34-45.
- Lemieux, C., and Bachand, F. (2009). Cotranscriptional recruitment of the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 to nascent transcripts and association with translating mRNPs. *Nucleic Acids Res.* 37, 3418-3430.

- Lemieux, C., Marguerat, S., Lafontaine, J., Barbezier, N., Bähler, J., and Bachand, F. (2011). A Pre-mRNA degradation pathway that selectively targets intron-containing genes requires the nuclear poly(A)-binding protein. *Mol. Cell* 44, 108-119.
- Lewis, JD., Görlich, D., and Mattaj, IW. (1996). A yeast cap binding protein complex (yCBC) acts at an early step in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 24, 3332-3336.
- Li, H., Dalal, S., Kohler, J., Vilardell, J., and White, SA. (1995a). Characterization of the pre-mRNA binding site for yeast ribosomal protein L32: the importance of a purine-rich internal loop. *J. Mol. Biol.* 250, 447-459.
- Li, Z., Paulovich, AG., and Woolford, JL Jr. (1995b). Feedback inhibition of the yeast ribosomal protein gene CRY2 is mediated by the nucleotide sequence and secondary structure of CRY2 pre-mRNA. *Mol. Cell Biol.* 15, 6454-6464.
- Li, Y., Chen, ZY., Wang, W., Baker, CC., and Krug, RM. (2001). The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs *in vivo*. *RNA* 7, 920-931.
- Liang, S., and Lutz, CS. (2006). p54nrb is a component of the snRNP-free U1A (SF-A) complex that promotes pre-mRNA cleavage during polyadenylation. *RNA* 12, 111-121.
- Liu, Q., Greimann, JC., and Lima, CD. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223-1237.
- Livingstone, M., Atas, E., Meller, A., and Sonenberg, N. (2010). Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys. Biol.* 7:021001.
- Lorentzen, E., Walter, P., Fribourg, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Klug, G., and Conti, E. (2005). The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 575-581.
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Conti, E. (2008). Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol. Cell* 29, 717-728.
- Luo, W., and Bentley, D. (2004). A ribonucleolytic rat torpedo degrades RNA polymerase II. *Cell* 119, 911-914.
- Luo, W., Johnson, AW., and Bentley, DL. (2006). The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev.* 20, 954-965.
- Ma, S., Bhattacharjee, RB., and Bag, J. (2009). Expression of poly(A)-binding protein is upregulated during recovery from heat shock in HeLa cells. *FEBS J.* 276, 552-570.

- Macías, S., Bragulat, M., Tardiff, DF., and Vilardell, J. (2008). L30 binds the nascent RPL30 transcript to repress U2 snRNP recruitment. *Mol. Cell* 30, 732-742.
- Malet, H., Topf, M., Clare, DK., Ebert, J., Bonneau, F., Basquin, J., Drazkowska, K., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., Saibil, HR., and Lorentzen, E. (2010). RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Rep.* 11, 936-942.
- Malet, H., and Lorentzen, E. (2011). Mechanisms of RNA recruitment by the exosome. *RNA Biol.* 8, 398-403.
- Mandel, CR., Bai, Y., and Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1099-1122.
- Mangus, DA., Amrani, N., and Jacobson, A. (1998). Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 18, 7383-7396.
- Mangus, DA., Evans, MC., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4, 223.
- Mangus, DA., Smith, MM., McSweeney, JM., and Jacobson, A. (2004a). Identification of factors regulating poly(A) tail synthesis and maturation. *Mol. Cell Biol.* 24, 4196-4206.
- Mangus, DA., Evans, MC., Agrin, NS., Smith, M., Gongidi, P., and Jacobson, A. (2004b). Positive and negative regulation of poly(A) nuclease. *Mol. Cell Biol.* 24, 5521-5533.
- Mao, H., and Williamson, JR. (1999). Local folding coupled to RNA binding in the yeast ribosomal protein L30. *J. Mol. Biol.* 292, 345-359.
- Mao, H., White, SA., and Williamson, JR. (1999). A novel loop-loop recognition motif in the yeast ribosomal protein L30 autoregulatory RNA complex. *Nat. Struct. Biol.* 6, 1139-1147.
- Marfatia, KA., Crafton, EB., Green, DM., and Corbett, AH. (2003). Domain analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Nab2p. Dissecting the requirements for Nab2p-facilitated poly(A) RNA export. *J. Biol. Chem.* 278, 6731-6740.
- Martin, G., Ostareck-Lederer, A., Chari, A., Neuenkirchen, N., Dettwiler, S., Blank, D., Rügsegger, U., Fischer, U., and Keller, W. (2010). Arginine methylation in subunits of mammalian pre-mRNA cleavage factor I. *RNA* 16, 1646-1659.
- Martineau, Y., Derry, MC., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, JJ., Shyu, AB., Imataka, H., Gehring, K., and Sonenberg, N. (2008). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell Biol.* 28, 6658-6667.

- Mašek, T., Valášek, L., Pospíšek, M. (2011). Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. *Methods Mol. Biol.* 703, 293-309.
- Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.* 19, 1512-1517.
- Mathew, R., Hartmuth, K., Möhlmann, S., Urlaub, H., Ficner, R., and Lührmann, R. (2008). Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 435-443.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841-847.
- Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J. Biol. Chem.* 265, 10857-10864.
- Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene (Amst.)* 123, 127-130.
- McBride, AE., and Silver, PA. (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106, 5-8.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, SD., Wickens, M., and Bentley, DL. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- McCracken, S., Lambermon, M., and Blencowe, BJ. (2002). SRm160 splicing coactivator promotes transcript 3'-end cleavage. *Mol. Cell Biol.* 22, 148-160.
- Meaux, S., and Van Hoof, A. (2006). Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *RNA* 12, 1323-1337.
- Michlewski, G., Sanford, JR., and Caceres, JF. (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol. Cell* 30, 179-189.
- Millevoi, S., Geraghty, F., Idowu, B., Tam, JL., Antoniou, M., and Vagner, S. (2002). A novel function for the U2AF 65 splicing factor in promoting pre-mRNA 3'-end processing. *EMBO Rep.* 3, 869-874.
- Millevoi, S., Loulergue, C., Dettwiler, S., Karaa, SZ., Keller, W., Antoniou, M., and Vagner, S. (2006). An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *EMBO J.* 25, 4854-4864.

Millevoi, S., Decorsière, A., Loulergue, C., Iacovoni, J., Bernat, S., Antoniou, M., and Vagner, S. (2009). A physical and functional link between splicing factors promotes pre-mRNA 3' end processing. *Nucleic Acids Res.* 37, 4672-4683.

Millevoi, S., and Vagner, S. (2010). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res.* 38, 2757-2774.

Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., and Tollervey, D. (2005). A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 25, 9996-10004.

Minvielle-Sebastia, L., Winsor, B., Bonneaud, N., and Lacroute, F. (1991). Mutations in the yeast RNA14 and RNA15 genes result in an abnormal mRNA decay rate; sequence analysis reveals an RNA-binding domain in the RNA15 protein. *Mol. Cell Biol.* 11, 3075-3087.

Minvielle-Sebastia, L., Preker, P.J., Wiederkehr, T., Strahm, Y., and Keller, W. (1997). The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7897-7902.

Minvielle-Sebastia, L., Beyer, K., Krecic, A.M., Hector, R.E., Swanson, M.S., and Keller, W. (1998). Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *EMBO J.* 17, 7454-7468.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-466.

Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol. Cell Biol.* 23, 6982-6992.

Monecke, T., Dickmanns, A., and Ficner, R. (2009). Structural basis for m7G-cap hypermethylation of small nuclear, small nucleolar and telomerase RNA by the dimethyltransferase TGS1. *Nucleic Acids Res.* 37, 3865-3877.

Moore, M.J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518.

Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.

Mor, A., Suliman, S., Ben-Yishay, R., Yunger, S., Brody, Y., and Shav-Tal, Y. (2010). Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 543-552.

- Mortazavi, A., Williams, BA., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621-628.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J., and Bordonné, R. (2002). Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell* 9, 891-901.
- Mowen, KA., Schurter, BT., Fathman, JW., David, M., and Glimcher, LH. (2004). Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes. *Mol. Cell* 15, 559-571.
- Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 119-122.
- Naeger, LK., Schoborg, RV., Zhao, Q., Tullis, GE., and Pintel, DJ. (1992). Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA in cis when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. *Genes Dev.* 6, 1107-1119.
- Nag, A., Narsinh, K., Kazerouninia, A., and Martinson, HG. (2006). The conserved AAUAAA hexamer of the poly(A) signal can act alone to trigger a stable decrease in RNA polymerase II transcription velocity. *RNA* 12, 1534-1544.
- Nag, A., Narsinh, K., and Martinson, HG. (2007). The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 662-669.
- Nakamoto, T. (2009). Evolution and the universality of the mechanism of initiation of protein synthesis. *Gene* 432, 1-6.
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenó, P., Lustig, A., and Wahle, E. (1995). Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res.* 23, 4034-4041.
- Ni, L., and Snyder, M. (2001). A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 2147-2170.
- Nilsen, TW. (1998). RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing. In *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 279-307.
- Nilsen, TW. (2000). The case for an RNA enzyme. *Nature* 408, 782-783.
- Nielsen, KH., Szamecz, B., Valasek, L., Jivotovskaya, A., Shin, BS., and Hinnebusch, AG. (2004). Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *EMBO J.* 23, 1166-1177.
- Niwa, M., Rose, SD., and Berget, SM. (1990). *In vitro* polyadenylation is stimulated by the presence of an upstream intron. *Genes Dev.* 4, 1552-1559.

- Niwa, M., and Berget, SM. (1991). Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses *in vitro* splicing of proximal but not distal introns. *Genes Dev.* 5, 2086-2095.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 75-117.
- Ohnacker, M., Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* *plal* gene encodes a poly(A) polymerase and can functionally replace its *Saccharomyces cerevisiae* homologue. *Nucleic Acids Res.* 24, 2585-2591.
- Ohno, M., Sakamoto, H., and Shimura, Y. (1987). Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5187-5191.
- Ong, SE., Mittler, G., and Mann, M. (2004). Identifying and quantifying *in vivo* methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat. Methods* 1, 119-126.
- Orozco, IJ., Kim, SJ., and Martinson, HG. (2002). The poly(A) signal, without the assistance of any downstream element, directs RNA polymerase II to pause *in vivo* and then to release stochastically from the template. *J. Biol. Chem.* 277, 42899-42911.
- Osheim, YN., Proudfoot, NJ., and Beyer, AL. (1999). EM visualization of transcription by RNA polymerase II: Downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage. *Mol. Cell* 3, 379-387.
- Osheim, YN., Sikes, ML., and Beyer, AL. (2002). EM visualization of Pol II genes in *Drosophila*: most genes terminate without prior 3' end cleavage of nascent transcripts. *Chromosoma* 111, 1-12.
- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, JF., Wellinger, RJ., Chabot, B., and Elela, SA. (2011). Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell* 147, 320-331.
- Park, NJ., Tsao, DC., and Martinson, HG. (2004). The two steps of poly(A)-dependent termination, pausing and release, can be uncoupled by truncation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeat domain. *Mol. Cell Biol.* 24, 4092-4103.
- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 121-127.
- Paule, MR., and White, RJ. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28, 1283-1298.
- Pawlak, MR., Scherer, CA., Chen, J., Roshon, MJ., and Ruley, HE. (2000). Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell Biol.* 20, 4859-4869.

- Pena, V., Rozov, A., Fabrizio, P., Lührmann, R., and Wahl, MC. (2008). Structure and function of an RNase H domain at the heart of the spliceosome. *EMBO J.* 27, 2929-2940.
- Peng, J., Murray, EL., and Schoenberg, DR. (2008). *In vivo* and *in vitro* analysis of poly(A) length effects on mRNA translation. *Methods Mol. Biol.* 419, 215-230.
- Perreault, A., Lemieux, C., and Bachand, F. (2007). Regulation of the nuclear poly(A)-binding protein by arginine methylation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 282, 7552-7562.
- Phatnani, HP., and Greenleaf, AL. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.* 20, 2922-2936.
- Plant, KE., Dye, MJ., Lafaille, C., and Proudfoot, NJ. (2005). Strong polyadenylation and weak pausing combine to cause efficient termination of transcription in the human γ -globin gene. *Mol. Cell Biol.* 25, 3276-3285.
- Proudfoot, N., and O'Sullivan, J. (2002). Polyadenylation: a tail of two complexes. *Curr. Biol.* 12, R855-R857.
- Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 272-278.
- Proudfoot, NJ. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25, 1770-1782.
- Qu, X., Lykke-Andersen, S., Nasser, T., Saguez, C., Bertrand, E., Jensen, TH., and Moore, C. (2009). Assembly of an export-competent mRNP is needed for efficient release of the 3'-end processing complex after polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 29, 5327-5338.
- Querido, E., and Chartrand, P. (2008). Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol.* 85, 273-292.
- Raabe, T., Bollum, FJ., and Manley, JL. (1991). Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature* 353, 229-234.
- Rain, JC., and Legrain, P. (1997). *In vivo* commitment to splicing in yeast involves the nucleotide upstream from the branch site conserved sequence and the Mud2 protein. *EMBO J.* 16, 1759-1771.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, AI., and Mann, M. (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12, 1231-1245.
- Reed, R., and Hurt, E. (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108, 523-531.
- Richard, P., and Manley, JL. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23, 1247-1269.

Rigo, F., and Martinson, HG. (2008). Functional coupling of last-intron splicing and 3'-end processing to transcription *in vitro*: the poly(A) signal couples to splicing before committing to cleavage. *Mol. Cell Biol.* 28, 849-862.

Rosonina, E., Kaneko, S., and Manley, JL. (2006). Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev.* 20, 1050-1056.

Rotenberg, MO., Moritz, M., and Woolford, JL Jr. (1988). Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. *Genes Dev.* 2, 160-172.

Rougemaille, M., Gudipati, RK., Olesen, JR., Thomsen, R., Seraphin, B., Libri, D., and Jensen, TH. (2007). Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J.* 26, 2317-2326.

Runner, VM., Podolny, V., and Buratowski, S. (2008). The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol. Cell Biol.* 28, 1883-1891.

Russo, P. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* mRNA 3' end forming signals are also involved in transcription termination. *Yeast* 11, 447-453.

Rutz, B., and Séraphin, B. (2000). A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J.* 19, 1873-1886.

Ryan, K. (2007). Pre-mRNA 3' cleavage is reversibly inhibited *in vitro* by cleavage factor dephosphorylation. *RNA Biol.* 4, 26-33.

Ryan, K., and Bauer, DL. (2008). Finishing touches: post-translational modification of protein factors involved in mammalian pre-mRNA 3' end formation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2384-2396.

Sachs, AB., Davis, RW., and Kornberg, RD. (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell Biol.* 7, 3268-3276.

Sadowski, M., Dichtl, B., Hübner, W., and Keller, W. (2003). Independent functions of yeast Pcf1 1p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *EMBO J.* 22, 2167-2177.

Salaun, C., MacDonald, AI., Larralde, O., Howard, L., Lochtie, K., Burgess, HM., Brook, M., Malik, P., Gray, NK., and Graham, SV. (2010). Poly(A)-binding protein 1 partially relocalizes to the nucleus during herpes simplex virus type 1 infection in an ICP27-independent manner and does not inhibit virus replication. *J. Virol.* 84, 8539-8548.

San Paolo, S., Vanacova, S., Schenk, L., Scherrer, T., Blank, D., Keller, W., and Gerber, AP. (2009). Distinct roles of non-canonical poly(A) polymerases in RNA metabolism. *PLoS Genet.* 5, e1000555.

Sanford, JR., Gray, NK., Beckmann, K., and Caceres, JF. (2004). A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev.* 18, 755-768.

Sato, H., Hosoda, N., and Maquat, LE. (2008). Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* 29, 255-262.

Sato, H., and Maquat, LE. (2009). Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* 23, 2537-2550.

Sayani, S., Janis, M., Lee, CY., Toesca, I., and Chanfreau, GF. (2008). Widespread impact of nonsense-mediated mRNA decay on the yeast intronome. *Mol. Cell* 31, 360-370.

Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, FP., Dastidar, EG., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, CM., and van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 56-62.

Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervy, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res.* 37, 1127-1140.

Schroder, PA., and Moore, MJ. (2005). Association of ribosomal proteins with nascent transcripts in *S. cerevisiae*. *RNA* 11, 1521-1529.

Schröder, JM., Klossok, T., and Weis, J. (2011). Oculopharyngeal muscle dystrophy: fine structure and mRNA expression levels of PABPN1. *Clin. Neuropathol.* 30, 94-103.

Schwer, B., and Shuman, S. (1996). Conditional inactivation of mRNA capping enzyme affects yeast pre-mRNA splicing *in vivo*. *RNA* 2, 574-583.

Shatkin, AJ., and Manley, JL. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* 7, 838-842.

Shcherbik, N., Wang, M., Lapik, YR., Srivastava, L., and Pestov, DG. (2010). Polyadenylation and degradation of incomplete RNA polymerase I transcripts in mammalian cells. *EMBO Rep.* 11, 106-111.

Shen, EC., Henry, MF., Weiss, VH., Valentini, SR., Silver, PA., and Lee, MS. (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.* 12, 679-691.

Shi, Y., Reddy, B., and Manley, J.L. (2006). PP1/PP2A phosphatases are required for the second step of Pre-mRNA splicing and target specific snRNP proteins. *Mol. Cell* 23, 819-829.

Shuman S. (2001). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 66, 1-40.

Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 6, e111.

Slater, G.S., and Birney, E. (2005). Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 6, 31.

Smith, J.J., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H.R., and Wahle, E. (1999). Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and *in vitro* methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* 274, 13229-13234.

Smith, D.J., Query, C.C., and Konarska, M.M. (2008). "Nought may endure but mutability": spliceosome dynamics and the regulation of splicing. *Mol. Cell* 30, 657-666.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.

Sontheimer, E.J., Sun, S., and Piccirilli, J.A. (1997). Metal ion catalysis during splicing of premessenger RNA. *Nature* 388, 801-805.

Staals, R.H., Bronkhorst, A.W., Schilders, G., Slomovic, S., Schuster, G., Heck, A.J., Rajmakers, R., and Pruijn, G.J. (2010). Dis3-like 1: a novel exoribonuclease associated with the human exosome. *EMBO J.* 29, 2358-2367.

Staley, J.P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.

St-André, O., Lemieux, C., Perreault, A., Lackner, D.H., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). Negative regulation of meiotic gene expression by the nuclear poly(A)-binding protein in fission yeast. *J Biol. Chem.* 285, 27859-27868.

Stewart, M. (2007). Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol. Cell*, 25, 327-330.

Stewart, M. (2010). Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35, 609-617.

Strässer, K., and Hurt, E. (2000). Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J.* 19, 410-420.

Strässer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, AG., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.

Swiercz, R., Person, MD., and Bedford, MT. (2005). Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3). *Biochem. J.* 386, 85-91.

Swinburne, IA., Meyer, CA., Liu, XS., Silver, PA., and Brodsky, AS. (2006). Genomic localization of RNA binding proteins reveals links between pre-mRNA processing and transcription. *Genome Res.* 16, 912-921.

Takagaki, Y., Manley, JL., MacDonald, CC., Wilusz, J., and Shenk, T. (1990). A multisubunit factor, CstF, is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Genes Dev.* 4, 2112-2120.

Tardiff, DF., and Rosbash, M. (2006). Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during *in vivo* spliceosome assembly. *RNA* 12, 968-979.

Tasto, JJ., Carnahan, RH., McDonald, WH., and Gould, KL. (2001). Vectors and gene targeting modules for tandem affinity purification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 657-662.

Terry, LJ., and Wenthe, SR. (2007). Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 178, 1121-1132.

Thakurta, AG., Ho Yoon, J., and Dhar, R. (2002). *Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. *Yeast* 19, 803-810.

Tian, B., Pan, Z., and Lee, JY. (2007). Widespread mRNA polyadenylation events in introns indicate dynamic interplay between polyadenylation and splicing. *Genome Res.* 17, 156-165.

Tomé, FM., Chateau, D., Helbling-Leclerc, A., and Fardeau, M. (1997). Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 7 Suppl 1:S63-69.

Tomecki, R., Kristiansen, MS., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, KM., Szczesny, RJ., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, JS., Stepien, PP., Dziembowski, A., and Jensen, TH. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* 29, 2342-2357.

Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., and Tollervey, D. (2002). Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol. Cell* 9, 1285-1296.

- Tran, DP., Kim, SJ., Park, NJ., Jew, TM., and Martinson, HG. (2001). Mechanism of poly(A) signal transduction to RNA polymerase II *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 21, 7495-7508.
- Tucker, M., Staples, RR., Valencia-Sanchez, MA., Muhrad, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427-1436.
- Urushiyama, S., Tani, T., and Ohshima, Y. (1997). The *prp1+* gene required for pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein that contains TPR motifs and is similar to Prp6p of budding yeast. *Genetics* 147, 101-115.
- Vagner, S., Vagner, C., and Mattaj, IW. (2000). The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes Dev.* 14, 403-413.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol. Cell Biol.* 20, 441-452.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.* 3, e189.
- Vilardell, J., and Warner, JR. (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes Dev.* 8, 211-220.
- Vilardell, J., Chartrand, P., Singer, RH., and Warner, JR. (2000a). The odyssey of a regulated transcript. *RNA* 6, 1773-1780.
- Vilardell, J., Yu, SJ., and Warner, JR. (2000b). Multiple functions of an evolutionarily conserved RNA binding domain. *Mol. Cell* 5, 761-766.
- von der Haar, T., Gross, JD., Wagner, G., and McCarthy, JE. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 503-511.
- Wahl, MC., Will, CL., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.
- Wahle, E. (1991). A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66, 759-768.
- Wahle, E., Lustig, A., Jenö, P., and Maurer, P. (1993). Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 268, 2937-2945.
- Wahle, E. (1995a). 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 183-194.

- Wahle, E. (1995b). Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J. Biol. Chem.* 270, 2800-2808.
- Wahle, E., and Ruesegger, U. (1999). 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 277-295.
- Wang, Q., Mosser, DD., and Bag, J. (2005). Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3673-3684.
- Wells, SE., Hillner, PE., Vale, RD., and Sachs, AB. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135-140.
- Wen, J., and Brogna, S. (2010). Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 29, 1537-1551.
- Wilhelm, BT., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, CJ., Rogers, J., and Bähler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239-1243.
- Win, TZ., Draper, S., Read, RL., Pearce, J., Norbury, CJ., and Wang, SW. (2006). Requirement of fission yeast Cid14 in polyadenylation of rRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1710-1721.
- Windgassen, M., Sturm, D., Cajigas, IJ., Gonzalez, CI., Seedorf, M., Bastians, H., and Krebber, H. (2004). Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Mol. Cell Biol.* 24, 10479-10491.
- Wolfe, KH., and Shields, DC. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, MA., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., and Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* 24, 40082-4093.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, JC., Dufour, ME., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., Libri, D., and Jacquier, A. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* 121, 725-737.
- Xue, Y., Bai, X., Lee, I., Kallstrom, G., Ho, J., Brown, J., Stevens, A., and Johnson, AW. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* RAI1 (YGL246c) is homologous to human DOM3Z and

encodes a protein that binds the nuclear exoribonuclease Rat1p. *Mol. Cell Biol.* 20, 4006-4015.

Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, MC., Aldaz, CM., and Bedford, MT. (2003). Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6464-6468.

Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R., and Yamamoto, M. (2010). Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells. *EMBO J.* 29, 2173-2181.

Yamashita, A., Chang, TC., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, CY., and Shyu, AB. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054-1063.

Yang, H., Duckett, CS., and Lindsten, T. (1995). iPABP, an inducible poly(A)-binding protein detected in activated human T cells. *Mol. Cell Biol.* 15, 6770-6776.

Yean, SL., Wuenschell, G., Termini, J., and Lin, RJ. (2000). Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature* 408, 881-884.

Yu, MC., Bachand, F., McBride, AE., Komili, S., Casolari, JM., and Silver, PA. (2004). Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev.*, 18, 2024-2035.

Yu, MC. (2011). The Role of Protein Arginine Methylation in mRNP Dynamics. *Mol. Biol. Int.* 2011, 163827.

Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Wyss, JC., and Stutz, F. (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol. Cell Biol.*, 22, 8241-8253.

Zhang, Z., Fu, J., and Gilmour, DS. (2005). CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes Dev.* 19, 1572-1580.

Zhao, W., and Manley, JL. (1996). Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol. Cell Biol.* 16, 2378-2386.

Zhao, J., Hyman, L., and Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 405-445.

Zhelkovsky, A., Helmling, S., and Moore, C. (1998). Processivity of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase requires interactions at the carboxyl-terminal RNA binding domain. *Mol. Cell Biol.* 18, 5942-5951.

Zorio, DA., and Bentley, DL. (2004). The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Exp. Cell Res.* 296, 91-97.